



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

CRISTIANE MARIA PEREIRA DA SILVA

**OBTENÇÃO DE BIOCIMENTOS DE HIDROXIAPATITA E β -TCP PARA
APLICAÇÕES ORTOPÉDICAS E ODONTOLÓGICAS**

FORTALEZA

2019

CRISTIANE MARIA PEREIRA DA SILVA

OBTENÇÃO DE BIOCIMENTOS DE HIDROXIAPATITA E β -TCP PARA APLICAÇÕES
ORTOPÉDICAS E ODONTOLÓGICAS

Monografia apresentada ao curso de bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Área de concentração: Multidisciplinar.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Lima Vale

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S579o Silva, Cristiane Maria Pereira da.
Obtenção de biocimentos de hidroxiapatita e β -TCP para aplicações ortopédicas e odontológicas /
Cristiane Maria Pereira da Silva. – 2019.
64 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Mariana Lima Vale.

1. Biocimento. 2. Hidroxiapatita. 3. β -TCP. 4. Fosfato de cálcio. 5. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 570

CRISTIANE MARIA PEREIRA DA SILVA

OBTENÇÃO DE BIOCIMENTOS DE HIDROXIAPATITA E β -TCP PARA APLICAÇÕES
ORTOPÉDICAS E ODONTOLÓGICAS

Monografia apresentada ao curso de
bacharelado em Biotecnologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de bacharel em
Biotecnologia.

Área de concentração: Multidisciplinar.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mariana Lima Vale (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ricardo Emilio Ferreira Quevedo Nogueira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Natureza que nos rege.

Aos meus pais, Ercília Maria e Valter Felipe.

E a todos que acreditam que a ciência e a
educação são como velas no escuro.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força em todos os momentos de dificuldade, principalmente me rodeando das pessoas certas.

À minha orientadora, professora Mariana Lima Vale, por ter me orientado todos esses anos, pela confiança, pela compreensão em momentos de dificuldade, por sempre me escutar e me ajudar em cada detalhe do trabalho, por ser um exemplo e por ter me acolhido no LAFICA.

Ao professor, Ricardo Emilio Ferreira Quevedo Nogueira, por ter me acolhido de imediato no Laboratório de Biomateriais, no segundo semestre do curso, por sempre confiar no meu trabalho e me ajudado nos momentos em que eu precisei.

Ao professor, Mario Roberto Pontes Lisboa, pelas discussões sempre engrandecedoras, por sempre estar disposto a me ensinar, pela paciência e orientação, por ter me ajudado a escrever o projeto e por ter sido um amigo todo esse tempo.

Ao professor, Diego Veras Wilke, por ter aberto as portas do LABBMAR para a realização dos ensaios de citotoxicidade e por ceder seu tempo para me ensinar.

Ao professor, Hermógenes David de Oliveira, por ter aceitado meu convite em participar da comissão examinadora, por ser um excelente professor e cientista que sempre contribui enormemente com suas opiniões e conselhos.

À professora, Renata Leitão, e suas alunas, Mariana e Luciana, por terem cedido as células de osteoblastos para realização do ensaio de citotoxicidade.

Ao Felipe, à Tamiris e ao Danilo, por me ajudarem a realizar os ensaios de citotoxicidade in vitro, agradeço a paciência.

Aos colegas do LAFICA, Bruno, Diego e principalmente a Anamaria, que mesmo sem participar do projeto sempre foi atenciosa, me ajudou no que pode, me ensinou todos esses anos em que estive no LAFICA, é uma inspiração para mim e um exemplo de pesquisadora.

À Universidade Federal do Ceará por todos os momentos que passei que me transformaram no que sou hoje.

A todo corpo docente e administrativo do curso de Bacharelado em Biotecnologia e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

À CAPES pela concessão de bolsa e financiamento da pesquisa.

Aos meus amigos de graduação Felipe Rhaynan, Larissa Belizário, Milena Maciel, Amanda Moura, Lenon Camilo, Bruna de Araújo, Matheus Monteiro e Lucas Lopes por sempre

estarem do meu lado e terem me proporcionado tanta felicidade no meio de algumas dificuldades que achei que não iria superar.

As minhas ex-professoras do IFCE, Cristianne, Dôra e Fabiana, por serem meu exemplo, sempre me ajudarem e por serem, provavelmente, as pessoas mais inspiradoras que eu já conheci.

À minha família, principalmente as minhas tias Lídia, Luzia, Santinha, Lidiane, Silvia e Aparecida por nunca terem deixado me faltar nada quando eu precisei. A minha avó, Erciliane, que de Recife sempre me manda amor. À minha prima, Raquel, por me amar incondicionalmente e sempre estar do meu lado.

A minha namorada, Karolini Herculano, por ter tornado tudo menos difícil esses anos, por ser meu porto seguro e minha parceira nos momentos bons e ruins.

Ao meu primo Anaximandro por ser meu irmão, sempre me confortar nos momentos difíceis e ser a minha certeza de amor em qualquer momento.

A minha mãe, Ercilia Maria, por ser minha inspiração e meu exemplo, por sempre ter batalhado por mim para me dar o que eu tenho de mais precioso: minha educação. Ao meu pai por nunca ter me deixado faltar nada e sempre estar de prontidão quando eu preciso.

Por fim, à minha tia e madrinha Sandra, que infelizmente não está mais aqui, por ter sido a minha pessoa preferida no mundo e que deixou uma marca em mim que nunca esquecerei.

“If you assume that there is no hope, you guarantee that there will be no hope. If you assume that there is an instinct for freedom, that there are opportunities to change things, than there is a possibility that you can contribute to making a better world”

(Noam Chomsky)

RESUMO

O uso de enxertos autógenos para reparos ósseos apesar de ser considerado "padrão ouro", possui algumas limitações associadas ao aumento de morbidade, dor, infecção, além do sacrifício de tecidos saudáveis. Para superar essas limitações, o desenvolvimento de enxertos ósseos sintéticos, como os biocimentos de fosfato de cálcio (BFC), tem despertado o interesse em pesquisadores e profissionais da área. Estudos vêm comprovando o excelente desempenho de biocêramicas bifásicas de hidroxiapatita (HA) e β -Fosfato tricálcio (β -TCP), entretanto, a pesquisa e o desenvolvimento de BFC que possuam tanto HA como β -TCP ainda são recentes, portanto, a investigação das suas propriedades e o desenvolvimento de novos métodos de obtenção são desejáveis. Neste trabalho, dois BFC foram obtidos através de metodologias diferentes, com o objetivo de atender tanto às necessidades da odontologia, quanto da ortopedia. O primeiro (BFC I) teve sua fase sólida obtida através da síntese no estado sólido e sua fase líquida foi uma solução de Na_2HPO_4 4%. O difratograma da fase sólida demonstrou que foi possível obter uma biocerâmica bifásica via estado-sólido, uma inovação interessante, visto que se trata de um método simples e barato. A análise do difratograma do BFC I confirmou as fases HA e β -TCP. Com relação ao tempo de pega e pH, respectivamente, esse apresentou o tempo inicial de 6 minutos e tempo final de 20 minutos e pH igual a 7,6. O tempo de pega do BFC I o limita à algumas aplicações ortopédicas, portanto, uma mudança na metodologia foi necessária para diminuí-lo. Com isso, o segundo (BFC II), teve sua fase sólida a partir dos métodos de precipitação em solução aquosa e via sol-gel, com sua fase líquida composta por uma solução de 2 M de H_3PO_4 e pirofosfato de sódio. A análise do difratograma do BFC II confirmou as fases HA e β -TCP, entretanto houve o aparecimento da fase monetita. Com relação ao tempo de pega e pH, respectivamente, este apresentou e tempo inicial de 3 minutos e tempo final de 7 minutos e pH igual a 7,0. Com relação à citotoxicidade *in vitro*, o BFC I foi analisado em diferentes concentrações (62,50 – 2000 $\mu\text{L}/\text{mL}$) através do método da sulfurodamina B (SRB) em contato direto com fibroblastos murinos da linhagem L929. Já o BFC II foi analisado a partir do método do Alamar Blue a partir do contato de células de osteoblastos murinos da linhagem OFCOL II com diferentes volumes do extrato do BFC II (10 μL , 20 μL , 40 μL e 80 μL). Ambos os testes de citotoxicidade comprovaram que os BFC I e II não são citotóxicos. Apesar de preliminares, as caracterizações físico-química e a ausência de citotoxicidade, indicam que os BFCs obtidos são materiais promissores para aplicações na ortopedia e odontologia.

Palavras-chave: Biocimento, Hidroxiapatita, β -TCP, Fosfato de cálcio, Citotoxicidade.

ABSTRACT

The use of autogenous grafts for bone repair is considered the "gold standard". However, it has some limitations related to increased morbidity, pain, infection, and the sacrifice of health tissues. To overcome these limitations, the development of synthetic bone grafts, such as calcium phosphate bioceramics (BFC), has caught the attention of scientists. Many studies cited excellent performances of the hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP) bioceramics. However, the researches and developments of HA and β -TCP BFC are still recent, therefore, an investigation of their properties and new methods of development are desirable. In this work, two BFC were obtained from different methods, aiming to meet both the needs of dentistry and orthopedics. The first (BFC I) had its solid phase synthesized by solid state and its liquid phase was a 4% Na_2HPO_4 solution. The solid phase diffractogram demonstrated that it was possible to obtain biphasic β -TCP/HA bioceramics by solid-state reaction, which is interesting since it is a simple and inexpensive method. An analysis of the BFC I diffractogram confirmed that the biocement has the two phases HA and β -TCP. Concerning the setting time and pH, respectively, BFC I has an initial setting time of 6 minutes and a final setting time of 20 minutes and the pH equal to 7.6. BFC I's setting time is limited to some orthopedic applications, so a change in methodology has been necessary. Thus, the second biocement (BFC II), had its solid phase by the precipitation in aqueous solution and sol-gel and its liquid phase was composed of a solution of 2 M H_3PO_4 and sodium pyrophosphate. An analysis of the BFC II diffractogram confirmed the HA and β -TCP phases, but the monetite phase occurred. Concerning the setting time and pH, respectively, it has an initial setting time of 3 minutes and a final setting time of 7 minutes, the pH was equal to 7.0. *In vitro* cytotoxicity of BFC I was analyzed by the sulfur rodamine B (SRB) method in direct contact with murine fibroblasts L929 strain. BFC II was analyzed by its extract in contact with murine osteoblast OFCOL II by the Alamar Blue method. The two cytotoxicity tests showed that BFC I and II are not cytotoxic. Although preliminary, the physicochemical characterization and the absence of cytotoxicity indicate that the BFCs obtained are promising materials for orthopedics and dentistry applications.

Keywords: Biocement, Hydroxyapatite, β -TCP, Calcium phosphate, Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciências que contribuem para o desenvolvimento das ciências dos biomateriais.....	19
Figura 2 – Desenvolvimento de biomateriais para aplicações biomédicas	21
Figura 3 – Preparo e processo de pega dos biocimentos de fosfato de cálcio.....	29
Figura 4 – Mecanismo de regeneração do osso após aplicação de HA em um defeito ósseo	30
Figura 5 – Testes baseados em cultura de células para avaliação de citotoxicidade em biomateriais.....	32
Figura 6 – Esquema da metodologia de obtenção e caracterização do BFC I	42
Figura 7 – Resumo da metodologia de obtenção e caracterização do BFC II	42
Figura 8 – Difratoograma de raios X do pó de fosfato de cálcio (biocerâmica) bifásico precursor do BFC I	43
Figura 9 – Difratoograma de raios X do BFC I	44
Figura 10 – Viabilidade celular em células L929 em contato direto com diferentes concentrações de BFC I.....	45
Figura 11 – Fotomicrografias de células L929 em cultura expostas a diferentes concentrações de BFC I.....	46
Figura 12 – Difratoograma de raios X do pó de fosfato de cálcio precursor do BFC II	47
Figura 13 – Difratoograma de raios X do BFC II	48
Figura 14 – Efeito do extrato do BFC II no crescimento celular	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fosfatos de cálcio sintéticos.....	25
Tabela 2 – Solubilidade e osteoindução de fosfatos de cálcio com diferentes razões Ca/P.....	26
Tabela 3 – Vias sintéticas de obtenção de Fosfatos de Cálcio.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -TCP	α – Fosfato tricálcio
β -TCP	β -Fosfato tricálcio
BFC	Biocimento de fosfato de cálcio
CPP	Pirofosfato de cálcio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
HA	Hidroxiapatita
ISO	Organização Internacional de Normalização
Kps	Produto de solubilidade
pH	Potencial hidrogeniônico
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido triclocoácetico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Biomateriais	18
2.2	Enxertos Ósseos	22
2.3	Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio	24
2.4	Biocimentos de Fosfato de Cálcio	28
2.5	Análise de citotoxicidade <i>in vitro</i> em biomateriais	31
3	JUSTIFICATIVA	33
4	OBJETIVOS	34
4.1	Objetivo geral	34
4.2	Objetivos específicos	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1	Síntese de pós de fosfato de cálcio via reação no estado sólido e preparação do BFC I	35
5.1.1	<i>Síntese dos pós de fosfato de cálcio – Precursores do BFC I</i>	35
5.1.2	<i>Preparação dos BFC I</i>	36
5.2	Síntese de pós de fosfato de cálcio via reação precipitação no meio aquoso e sol-gel e preparação do BFC II	36
5.2.1	<i>Síntese dos pós de fosfato de cálcio – Precursores do BFC II</i>	36
5.2.2	<i>Preparação dos BFC II</i>	37
5.3	Análise por difração de raios X (DRX)	37
5.4	Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)	38
5.5	Tempo de pega	38
5.6	Análise da Citotoxicidade <i>in vitro</i> do BFC I – Método SRB	39
5.6.1	<i>Preparação das amostras para ensaio <i>in vitro</i></i>	39
5.6.2	<i>Cultivo celular</i>	39
5.6.3	<i>Citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método da Sulforodamina B</i>	39
5.7	Análise da Citotoxicidade <i>in vitro</i> do BFC II – Método Alamar Blue	40
5.7.1	<i>Preparação do extrato para ensaio <i>in vitro</i></i>	40
5.7.2	<i>Cultivo Celular</i>	40
5.7.3	<i>Citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método da Alamar Blue</i>	41
6	RESULTADOS	43

6.1	Caracterização do precursor sólido e do BFC I.....	43
6.1.2	<i>Análise por difração de raios X.....</i>	43
6.1.3	<i>Tempo de Pega e Potencial de Hidrogênio (pH).....</i>	44
6.1.4	<i>Citotoxicidade in vitro pelo método da Sulforodamina B.....</i>	45
6.2	Caracterização do precursor sólido e do BFC II.....	46
6.2.1	<i>Análise por difração de raios X.....</i>	46
6.2.2	<i>Tempo de Pega e Potencial de Hidrogênio (pH).....</i>	48
6.2.3	<i>Citotoxicidade in vitro pelo método Alamar Blue.....</i>	48
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos conquistados desde o início da Terceira Revolução Industrial - 1950 até a atualidade - impulsionaram e revolucionaram pesquisas científicas no campo das ciências da saúde, proporcionando o estímulo ideal para o desenvolvimento de ciências como a bioengenharia e a medicina regenerativa. Apesar de implantações de materiais no corpo humano ocorrerem desde civilizações antigas, o impulsionamento dessas novas áreas científicas multidisciplinares incitou o interesse de pesquisadores na busca e no desenvolvimento de materiais que substituíssem ou proporcionassem a regeneração de órgãos e tecidos do corpo humano, os chamados Biomateriais (RATNER *et al.*, 1997).

Atualmente, considerando os crescentes avanços da medicina regenerativa, o aumento da expectativa de vida e conseqüentemente o interesse em novas terapias para doenças ósseas comuns em idosos (ex.: osteoporose), além da busca por melhorias na qualidade de vida de pessoas que perderam funções ou partes do corpo, os biomateriais que auxiliem no tratamento de doenças ósseas se fazem cada vez mais necessários para proporcionar o bem-estar da população. No Brasil, de acordo com dados do Sistema Único de Saúde (SUS), as cirurgias ortopédicas chegavam a quase 300 mil por ano em 2011, chegando a 182 mil pessoas na fila por cirurgias em traumatologia em 2017, segundo o Sistema Nacional de Regulação do Ministério da Saúde. Já na odontologia, segundo dados do Conselho Federal de Odontologia (CFO), cerca de 800 mil implantes e 2,4 milhões de componentes de próteses são vendidos por ano no país.

O uso de enxertos autógenos para reparos ósseos, apesar de ser considerado “padrão ouro”, possui algumas limitações associadas ao aumento da morbidade, dor, infecção e sacrifício de tecidos saudáveis. Uma alternativa ao uso desses enxertos é a utilização de enxertos xenógenos e alógenos. Entretanto, esses também possuem limitações, visto que, por se tratarem de enxertos vindos de organismos diferentes, podem ocasionar rejeição imunológica, além de outros problemas relacionados à qualidade e estrutura do material e até mesmo levantar conflitos pessoais, culturais e éticos (ex.: pacientes veganos ou adeptos a religiões que se opõem ao transplante de materiais biológicos entre pessoas) (AMARAL, 2013; CHEN *et al.*, 2018).

A aplicação de biomateriais sintéticos para regeneração de tecidos ósseos, como uma alternativa aos demais enxertos é relevante, pois eles não danificam tecidos saudáveis, não trazem os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente. Podem, ainda, ser de fácil dissolução e absorção, ao mesmo tempo em que

permitem e estimulam a formação óssea (ZHOU *et al.*, 2012). Portanto, devido a todas as vantagens, é crescente o interesse em pesquisas relacionadas ao uso de enxertos sintéticos como as biocerâmicas e biocimentos de fosfato de cálcio (BFC) com características e desempenhos iguais ou superiores aos demais enxertos.

Nesse cenário, estudos vem comprovando o excelente desempenho de biocerâmicas que contenham os fosfatos de cálcio sintéticos Hidroxiapatita (HA) e β -Fosfato tricálcio (β -TCP devido a características como resistência mecânica, biodegradação acompanhada do remodelamento ósseo, biocompatibilidade, osteocondução, osteoindução e a capacidade de formar fortes ligações com o tecido ósseo do hospedeiro (CHENG *et al.*, 2009). Entretanto, a pesquisa e o desenvolvimento de BFC que contenham ambas as fases HA e β -TCP ainda são recentes e controle de suas propriedades ainda necessitam de profunda investigação. Portanto, o desenvolvimento de novos BFC com ambas as fases, bem como o desenvolvimento de novas propostas para o aperfeiçoamento de suas propriedades, ainda são necessárias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

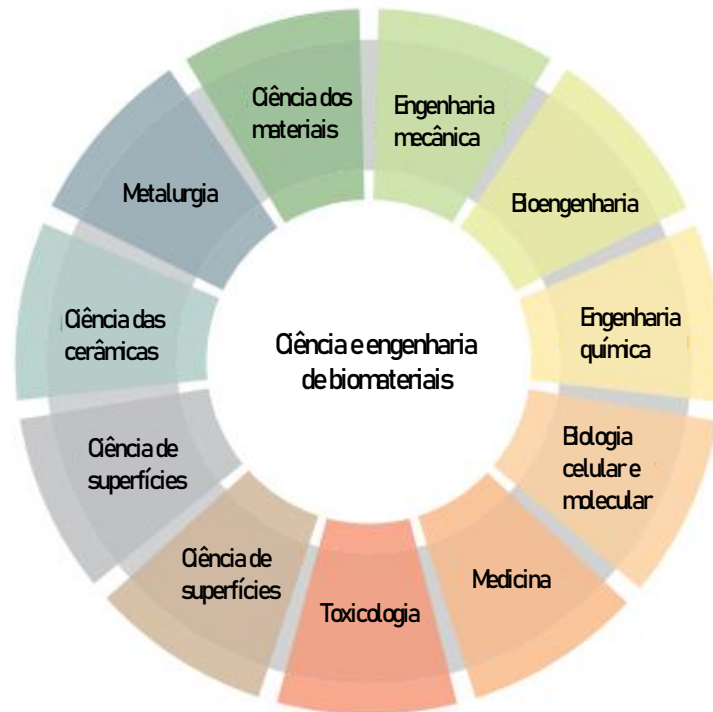
2.1 Biomateriais

O conceito de biomateriais, primeiramente proposto por WILLIAMS (1986), os definia como materiais inertes que atuam como dispositivos médicos utilizados na intenção de interagirem com sistemas biológicos. Posteriormente, Helmus & Tweden (1995) os definiram como substâncias naturais ou sintéticas (ou uma combinação dessas) que não sejam drogas e que podem ser usadas tanto completamente, como parcialmente, por um determinado período de tempo, para o tratamento, substituição e regeneração de órgãos e tecidos, além de também serem utilizados para recuperar funções do corpo humano. Atualmente, após o desenvolvimento de novas aplicações mais sofisticadas para biomateriais, o termo biomaterial passou a ser definido como: materiais projetados para assumir uma forma que possa direcionar, por meio de interações com sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico (Conference on Definitions in Biomaterials, 2018, Chengdu, China).

A ciência dos biomateriais é entendida como o estudo das interações químicas, físicas e biológicas de materiais com o ambiente fisiológico. Trata-se, portanto, de uma ciência multidisciplinar que abrange o interesse de pesquisadores de diversas áreas da ciência (HUEBSCH; MOONEY, 2009). A Figura 1 ilustra as áreas da ciência que fazem parte da multidisciplinaridade da ciência dos biomateriais.

A história dos biomateriais acompanha a própria história da medicina e se inicia a partir das primeiras investigações direcionadas ao funcionamento do corpo humano, quando nossos ancestrais perceberam que determinados tipos de materiais são capazes de interagir com o organismo auxiliando no tratamento de doenças ou traumas (HUEBSCH; MOONEY, 2009). Entretanto, antes do estabelecimento e o entendimento de conceitos como o de biocompatibilidade e a preocupação com esterilização para evitar infecções, muitos dispositivos desenvolvidos estavam fadados ao fracasso (RATNER; BRYANT, 2004a). Entende-se, portanto, que biocompatibilidade é a capacidade de um biomaterial de desempenhar sua função desejada sem provocar efeitos fisiológicos locais ou sistêmicos indesejáveis, sendo capaz de gerar a resposta celular ou tecidual benéfica mais apropriada naquela situação e otimizar o desempenho clinicamente relevante dessa terapia (WILLIAMS, 2008).

Figura 1 – Ciências que contribuem para o desenvolvimento das ciências dos biomateriais.



Fonte: Adaptado de RATNER, 2019

Os avanços no entendimento de biocompatibilidade, a preocupação com esterilização e a ascensão das ciências dos materiais, nanotecnologia e ciências como a imunologia, proteômica e genômica, devido a revolução da biologia molecular, influenciaram definitivamente as pesquisas em biomateriais e em como esses podem ser idealizados, obtidos e modificados para performarem funções que atendam às necessidades de profissionais da saúde e pacientes. No presente, como consequência desses avanços, estudos são realizados com o objetivo de entender as respostas imunológicas provocadas pelo implante de biomateriais, assim como também o desenvolvimento de materiais antimicrobianos ou nanocarreadores de antibióticos que ajudem a combater infecções (ALBUQUERQUE, 2012; ASLAN *et al.*, 2010; CRAVEDI *et al.*, 2017; HUEBSCH; MOONEY, 2009; WALMSLEY *et al.*, 2015).

A biotecnologia também é uma ferramenta poderosa utilizada no desenvolvimento de novos biomateriais. Através dos avanços em biotecnologia foi possível, por exemplo, o desenvolvimento de novas metodologias para cultura de células; o desenvolvimento de dispositivos *drug-delivery*, de terapias-alvo e do direcionamento genético para tratamento de doenças ósseas; a possibilidade de encapsular biomoléculas, e o uso de técnicas de

biotecnologia estrutural e computacional para otimizar análises da performance de novos biomateriais (ALMOUEMEN; KELLY; O'LEARY, 2019; BAHRAMI *et al.*, 2018; GERING *et al.*, 2019; RATNER; BRYANT, 2004b; SINGH *et al.*, 2019).

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com as respostas induzidas no organismo. Portanto, de acordo com Hench & Wilson (1993) dependendo do comportamento fisiológico, os biomateriais podem ser:

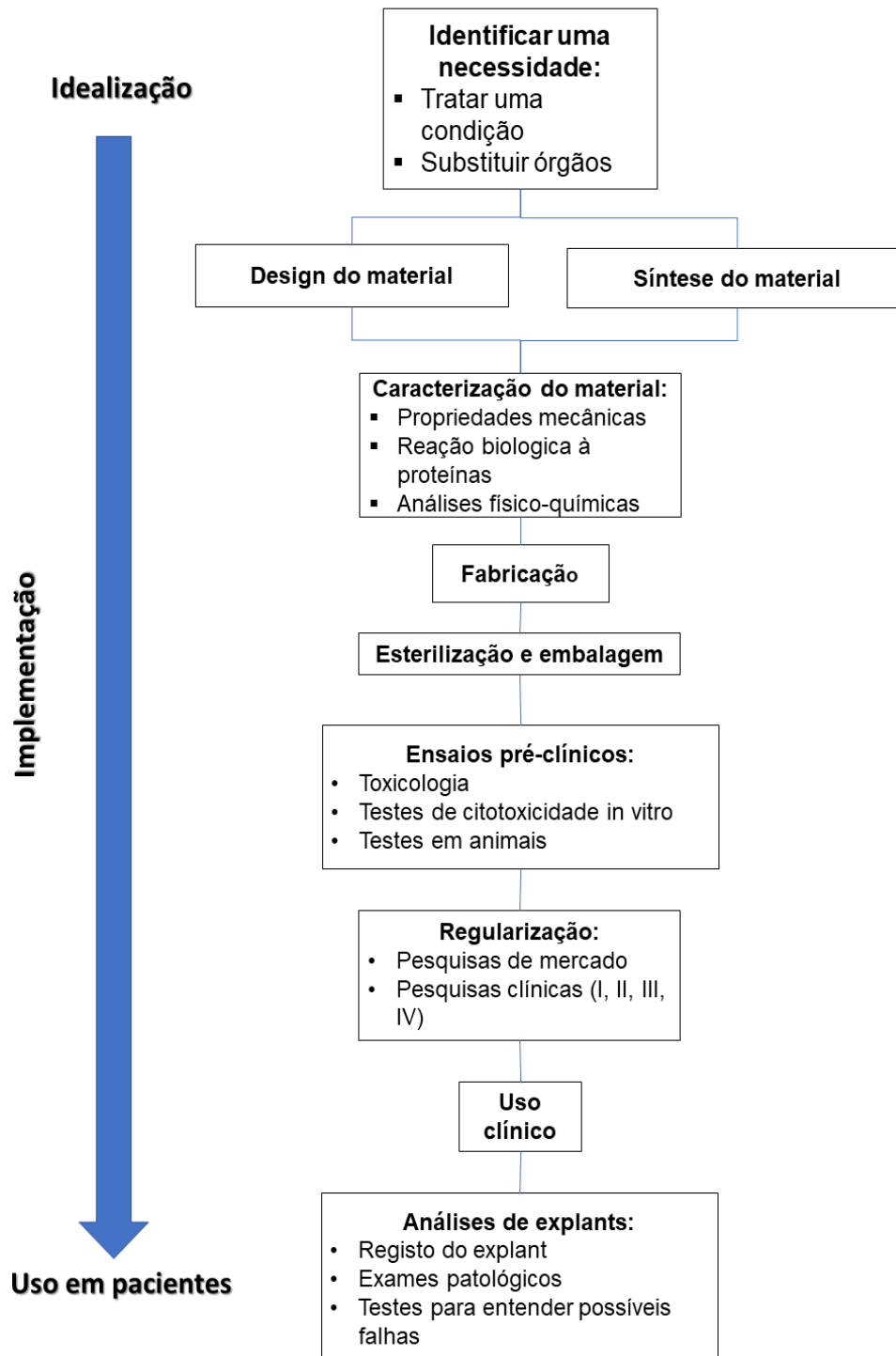
- Biotoleráveis: quando são tolerados pelo corpo humano por permitir a formação de tecido fibroso circundante que o isola dos tecidos adjacentes. Quanto maior a fibrose, menor a tolerabilidade do material, pois maior deverá ser a camada do tecido fibroso para isolar e evitar que a liberação de compostos químicos pelo desgaste não seja prejudicial ao organismo.
- Bioinertes: quando também são tolerados pelo organismo, entretanto, não liberam substâncias que podem ser nocivas a este, logo, a camada de tecido fibroso circundante é mínima.
- Bioativos: materiais capazes de interagir com os tecidos do organismo. Um bom exemplo é a osseointegração oferecida pelos enxertos ósseos sintéticos e o tecido ósseo devido a semelhança da composição química.
- Absorvíveis: quando após um determinado tempo de implantação, esses são degradados pelo corpo humano sem causar nenhum dano. Essa característica é importante visto que a degradação deve ocorrer sem a geração de subprodutos prejudiciais que obstruam o processo de cicatrização ou, posteriormente, iniciem complicações no corpo humano, e também é bastante interessante para aplicações cirúrgicas visto que evita uma segunda intervenção para retirada do material.

Com relação ao tipo de material, os biomateriais usados em medicina podem ser classificados basicamente em biomateriais metálicos, cerâmicos e biopolímeros. Esses diferem em suas propriedades com relação à interação com o corpo humano, bem como suas propriedades físico-químicas. A escolha do material ideal, a análise de suas propriedades como biocompatibilidade, interação tecido-biomaterial, propriedades físico-químicas, além de ensaios clínicos e pré-clínicos, deverão ser realizadas para que o biomaterial possa, por fim, exercer sua aplicabilidade (RATNER *et al.*, 1997). A Figura 2, resume a trajetória utilizada para o desenvolvimento de biomateriais desde sua idealização até o uso clínico.

Enxertos ósseos, enxertos de pele, órgãos artificiais (rins, coração), *scaffolds* para regeneração e cultura celular, próteses, catéteres, lentes intraoculares, lentes de contato, tendões artificiais e ligamentos, implantes dentários, biossensores, próteses de vaso sanguíneo são algumas das diversas aplicações e possibilidades fornecidas através do desenvolvimento da

ciência dos biomateriais (KIM *et al.*, 2019; KÖNÖNEN; KIVILAHTI, 2001; MALLICK; COX, 2013; RATNER *et al.*, 1997; VO-DINH; CULLUM, 2000; WANG; YEUNG, 2017).

Figura 2 – Desenvolvimento de biomateriais para aplicações biomédicas



2.2 Enxertos Ósseos

Enxertos ósseos são utilizados frequentemente no contexto cirúrgico com o objetivo de promover o ambiente necessário para a regeneração óssea após lesões, injúrias ou falhas (BAUER; MUSCHLER, 2000a). Por ano, pelo menos 2 milhões de cirurgias com a aplicação de enxertos ósseos são realizadas pelo mundo. Conseqüentemente, esse tipo de procedimento ocupa a segunda posição entre os transplantes de tecidos mais realizados após as transfusões sanguíneas (WANG; YEUNG, 2017).

A justificativa para o uso de enxertos ósseos se dá pela necessidade de fornecer um ambiente fisiológico e estrutural que mantenha a homeostase durante a formação do novo osso. Esse ambiente deve permitir a sobrevivência e proliferação células viáveis, vascularização adequada, estabilidade e presença de fatores e matriz de crescimento. Participam dos eventos biológicos que caracterizam o reparo ósseo uma série de reações moleculares complexas que estimulam o recrutamento e diferenciação de células especializadas do metabolismo ósseo como osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (JACOBS, 2017). Os osteoblastos são células derivadas de células-tronco mesenquimais e especializadas na síntese da matriz óssea, já os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea. Osteócitos são osteoblastos maduros que perdem a capacidade de síntese da matriz óssea, mas são importantes na homeostase do tecido ósseo (DESCHASEAUX; SENSÉBÉ; HEYMANN, 2009). O resultado desses eventos é a formação de um novo osso com as mesmas propriedades biológicas e físico-químicas idênticas ao osso não lesionado adjacente (DIMITRIOU *et al.*, 2011).

O osso é um material compósito cuja sua matriz extracelular consiste de minerais, colágeno, água, proteínas não colágenas, vasos sanguíneos e lipídios que contribuem para suas funções mecânicas e metabólicas. A porção mineral do osso é constituída em sua maioria por fosfato de cálcio (aproximadamente 60% do peso ósseo), o qual também é o principal constituinte do esmalte dentário (aproximadamente 90%) (BOSKEY; GEHRON, 2013; ELIAZ; METOKI, 2017).

A estrutura e a proporção dos componentes ósseos diferem com a idade, local e histórico, resultando em diferentes tipos de ossos que exibem características físico-químicas e funcionais distintas, sendo os principais tipos o esponjoso e cortical. Dessa forma, o osso não funciona apenas para fornecer suporte estrutural e proteção aos órgãos, mas também está envolvido na manutenção da homeostase mineral e no fornecimento de células-tronco hematopoiéticas e reservatório de células sanguíneas para o resto do corpo. Conseqüentemente,

fazem parte do metabolismo ósseo uma série de ciclos constantes de reabsorção e renovação, passando por uma contínua troca química e remodelação estrutural, devido à regulação hormonal interna e às demandas mecânicas externas (HING, 2005).

Embora o tecido ósseo possua a capacidade de se regenerar naturalmente em resposta à lesão, bem como durante o desenvolvimento esquelético ou a remodelação contínua ao longo da vida adulta, complicações no processo de regeneração ocorrem com frequência em algumas situações como, por exemplo, na regeneração de grandes defeitos ósseos criados por trauma, infecção, ressecção de tumores e anormalidades esqueléticas, ou em casos em que o processo regenerativo é comprometido, incluindo necrose, não uniões atróficas e osteoporose (BAUER; MUSCHLER, 2000b; DIMITRIOU *et al.*, 2011). Nessas condições, o tecido ósseo não é capaz de realizar naturalmente os processos que resultam na regeneração óssea, sendo, portanto, necessário o uso de enxertos para auxiliar, guiar e promover o crescimento de um novo osso.

Os enxertos ósseos podem ser classificados em autólogos, alógenos, xenógenos e sintéticos. Os enxertos autógenos são retirados de outros tecidos saudáveis do próprio indivíduo; os enxertos alógenos são provenientes de outro indivíduo da mesma espécie; enxertos xenógenos são provenientes de espécies diferentes como, por exemplo, bovinos; enxertos sintéticos são produzidos em laboratório como, por exemplo, os materiais a base de fosfato de cálcio sintético (KUMAR; VINITHA; FATHIMA, 2013).

Adicionalmente, para que possam participar da regeneração óssea, os enxertos precisam apresentar algumas propriedades biológicas como:

- Osteocondução: essa propriedade caracteriza a capacidade do enxerto de proporcionar uma estrutura ideal para que ocorra uma regeneração óssea guiada. Portanto, os enxertos ósseos funcionam como *scaffolds* que oferecem o arcabouço capaz de hospedar células essenciais na regeneração óssea, como os osteoblastos e osteoclastos. Dessa forma, a cicatrização ocorre na superfície ou através de poros, canais ou tubos do material (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001; JACOBS, 2017)

- Osteoindução: um material é osteoindutor quando é capaz fornecer um estímulo biológico que promove o recrutamento, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais locais ou transplantadas em osteoblastos maduros (BAUER; MUSCHLER, 2000b; JACOBS, 2017). Biomateriais que contem fosfato de cálcio são potenciais osteoindutores, assim como o que contem alumina, titânio ou cerâmica de vidro, visto que sua composição química é ideal para promover osteoindução (WINKLER *et al.*, 2018).

- Osseointegração: segundo o *Dicionário Médico Ilustrado de Dorland*, essa propriedade é definida como ancoragem direta de um implante pela formação de tecido ósseo ao seu redor sem crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante. Em 2017, ALBREKTSSON e colaboradores propuseram uma nova definição para osseointegração, onde esta é definida como uma reação de corpo estranho onde a regeneração óssea ocorre como uma reação de defesa para proteger o implante dos tecidos.

- Osteogênese: um material osteogênico pode ser definido como um conjunto de células vivas capazes de se diferenciar em células essenciais no mecanismo de regeneração óssea (ex.: osteoblastos). Os enxertos ósseos osteogênicos possuem toda a estrutura, os elementos celulares e fatores de crescimento necessários para formação do novo osso. O mais utilizado é o osso autógeno, que é comumente retirado da crista ilíaca (JACOBS, 2017).

2.3 Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio

Cerâmicas podem ser definidas como materiais sólidos inorgânicos e não metálicos que são obtidas através da aplicação de calor ou de pressão e calor (BARSOUM, 2002). Quando cerâmicas são utilizadas no intuito de tratar ou substituir partes do corpo, essas são chamadas de biocerâmicas.

As biocerâmicas de fosfato de cálcio foram propostas, em 1920, para aplicações biomédicas, após a comprovação de que defeitos tratados com tricálcio fosfato demonstraram crescimento ósseo mais rápido do que nos defeitos não tratados (BEN-NISSAN, 2002). Essas logo se destacaram como enxertos ósseos por apresentarem características ótimas para essa aplicação como bioatividade, biocompatibilidade, osseointegração, osteoindução, osteocondução, absorção, além composição bastante similar à do osso. Outras características apresentadas pelas biocerâmicas como a capacidade de funcionarem como dispositivos drug-delivery e a habilidade de formarem ligações com o tecido ósseo, minimizando a formação da capsula fibrosa, também são importantes para sua aplicabilidade. Adicionalmente, essas podem ser encontradas tanto em forma de blocos, como também em forma de granulados (ELIAZ; METOKI, 2017; TANG *et al.*, 2018; YUAN *et al.*, 2010).

Fosfatos de cálcio são minerais que contém cátions de cálcio (Ca^{2+}), juntamente com ânions de ortofosfato, metafosfato, ou pirofosfato e, às vezes, hidrogênio (Íons H^+) ou hidróxido (OH^-). Dependendo da temperatura, impurezas e presença de água, os fosfatos de cálcio podem existir em diferentes fases. Os que possuem uma razão atômica Ca/P entre 1,5 e

1,67 são chamados de apatitas, por exemplo, HA ou fluorapatita. O termo apatita foi cunhado, em 1786, pelo geólogo alemão Abraham Gottlob Werner, com base na antiga palavra grega "apatao", que significa "enganar" (BOSE; TARAFDER, 2012; ELIAZ; METOKI, 2017). De acordo com a Tabela 1, é possível observar os diferentes tipos de fosfatos de cálcio possíveis de obter sinteticamente.

Tabela 01 – Fosfatos de cálcio sintéticos

Razão Ca/P	Fórmula química	Nome
2,0	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tetracálcio
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ $\text{Ca}_{10-2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita Fosfato de cálcio amorfo
1,5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tricálcio
1,33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcio
1,0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato dicálcio dihidratado
1,0	CaHPO_4	Fosfato dicálcio
1,0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Pirofosfato de cálcio
1,0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Pirofosfato de cálcio dihidratado
0,7	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	Fosfato heptacálcio
0,67	$\text{CaH}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	Fosfato dihidrógeno tetracálcio
0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato monocálcio monohidratado
0,5	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	Metafosfato de cálcio

Fonte: Adaptado de FERRAZ, 2000

Apesar de similaridades na composição química, por possuírem basicamente íons fosfato e cálcio, nem todos os fosfatos de cálcio possuem as mesmas propriedades biológicas e físico-químicas. Dependendo da razão Ca/P estes podem diferir entre solubilidade, degradação no organismo e bioatividade. A propriedade osteoindutora do material também é afetada tanto pela razão Ca/P, quanto por características como solubilidade, topografia da superfície (ex.: macro ou microporosidade) (SAMAVEDI; WHITTINGTON; GOLDSTEIN, 2013; TANG et al., 2018). A partir da Tabela 2, é possível visualizar as diferenças entre solubilidade e osteoindução de acordo com a razão Ca/P.

Tabela 2 – Solubilidade e osteoindução de fosfatos de cálcio com diferentes razões Ca/P

Fosfato de cálcio	Solubilidade (K_{sp})	Razão Ca/P	Osteoindução
α -TCP	$8,46 \times 10^{-32}$	1,5	+
Hidroxiapatita	$6,62 \times 10^{-126}$	1,67	++
β -TCP	$2,07 \times 10^{-33}$	1,5	+++
Fosfatos de cálcio bifásicos	Depende da razão TCP/HA	1,5-1,67	++++

Fonte: Adaptado de SAMAVEDI; WHITTINGTON; GOLDSTEIN, 2013

Compreender as propriedades físico-químicas de cada tipo de fosfato de cálcio, como elas se relacionam e entender como irão afetar a performance no reparo ósseo é imprescindível para que o pesquisador possa escolher qual fase se enquadrará melhor de acordo com a aplicação de seu interesse. A taxa de dissolução das biocerâmicas, por exemplo, afeta os estágios iniciais de implantação e depende de vários parâmetros como porosidade, atividade biológica de macrófagos e osteoclastos, pH, temperatura e solubilidade. A dissolução parcial causa um aumento na concentração local de íons cálcio e fosfato, aumentando assim seu grau de saturação no microambiente, resultando na precipitação de microcristais de apatita biológica que favorecem a formação do tecido ósseo. Esses microcristais incorporam outros íons (por exemplo, carbonato, magnésio) e macromoléculas orgânicas a partir de fluidos biológicos. Essa precipitação superficial pode incorporar várias proteínas e fatores de crescimento presentes no microambiente que podem promover a ligação e a função celular. O novo crescimento ósseo na superfície da biocerâmica forma uma ponte entre o osso hospedeiro e o material. Eventualmente, esse osso imaturo é remodelado (ELIAZ; METOKI, 2017).

A solubilidade de sólidos em solução aquosa, como as biocerâmicas em ambiente fisiológico, é caracterizada por um equilíbrio entre a superfície do sólido e as espécies em solução, que exibem um produto de atividade iônica constante correspondente ao produto de solubilidade (K_{sp}). O K_{sp} é característico de um composto sólido e está relacionado à sua composição. No pH fisiológico, a solubilidade, expressa como a quantidade de íons Ca²⁺ e ortofosfato em solução em equilíbrio, diminui na ordem TTCP > α -TCP > DCPD > DCPA OCP > β -TCP > HA (REY, C., COMBES, C., DROUET, C., & GROSSIN, 2011).

Já a porosidade e arquitetura estrutural afetam diretamente as propriedades mecânicas de uma biocerâmica, onde a resistência mecânica diminui rapidamente com o

aumento da porosidade. Além disso, a taxa e a qualidade da integração óssea têm sido relacionadas ao tamanho e quantidade dos poros tanto em função da permeabilidade estrutural quanto da mecanotransdução (o processo pelo qual as células convertem estímulos mecânicos em uma resposta química). A porosidade também está relacionada à capacidade de absorção e no recrutamento de fatores de crescimento, difusão de fluidos, oxigênio, nutrientes e substâncias bioativas para o crescimento celular, o que é vital para a regeneração dos ossos e tecidos moles. No entanto, a presença de tamanhos de poros grandes pode prejudicar a regeneração óssea, permitindo que as células de tecido mole migrem através da estrutura porosa do material, superpopulem o local do defeito e inibam a infiltração e a atividade das células formadoras de ossos (ELGALI *et al.*, 2017; HING, 2005).

Uma das grandes vantagens das biocerâmicas de fosfato de cálcio é que estas são sintetizadas em laboratório, portanto, várias técnicas foram desenvolvidas para obtenção de fosfatos de cálcio sintéticos. Desta forma, as rotas de síntese mais utilizadas e estudadas estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 – Vias sintéticas de obtenção de Fosfatos de Cálcio

Tipo	Método	Princípio	Características
Síntese úmida	Precipitação	Precipitação de soluções aquosas saturadas contendo íons cálcio e fosfato.	Alta produtividade, baixo custo, cristalinidade e tamanho de partícula heterogêneas
	Precipitação assistida por micro-ondas	Aplicação de irradiação de micro-ondas durante a precipitação de fosfato de cálcio.	Taxas de reação aceleradas, melhor controle do tamanho das nanopartículas
	Precipitação assistida por ultrassom	Aplicação do ultrassom durante a precipitação de fosfato de cálcio.	Taxas de reação aceleradas Melhor controle sobre o tamanho das nanopartículas
	Precipitação por emulsão	Precipitação de fosfato de cálcio em um sistema de emulsão.	Reduz aglomerações, forma uniforme, presença de solventes orgânicos
Síntese sol-gel		Hidrólise de precursores que produzem um sol (suspensão coloidal de nanopartículas) que pode ser convertido em gel amorfo e solidificado por tratamentos térmicos	Síntese de grandes quantidades, baixo custo, forte controle sobre a composição química

Síntese hidrotérmica		Tratamento em alta temperatura e pressão de fases precursoras de fosfato de cálcio nanoestruturadas em meio aquoso	Pós-processamento para melhorar o controle sobre a homogeneidade das nanopartículas
Métodos secos	Combustão	Preparação de pó por aplicação de alta temperatura (chama) a uma solução precursora contendo cálcio e fosfato	Boa cristalinidade e estequiometria, possibilidade de aumento de escala, tendência para aglomeração de nanopartículas
	Reação no estado sólido	Ativação mecânica de alta energia do pó precursor	Aumento da cristalinidade com aumento da ativação

Fonte: Adaptado de ALVES CARDOSO; JANSEN; G. LEEUWENBURGH, 2012

2.4 Biocimentos de Fosfato de Cálcio

Diferentemente das biocerâmicas de fosfato de cálcio, os biocimentos de fosfato de cálcio (BFC) são formados por uma combinação de uma ou mais fases sólidas (pós de fosfato de cálcio, biocerâmicas) capazes de formar uma pasta plástica quando misturados com água ou uma solução aquosa, iniciando o processo de endurecimento à temperatura ambiente ou corpórea (ZHANG *et al.*, 2014). Os BFC foram primeiramente propostos por LerGeros e Brown & Chow, na década de 80, com o objetivo de estender a adaptabilidade e moldabilidade dos substitutos ósseos de fosfato de cálcio. Em 1996 foram então aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA (GINEBRA *et al.*, 2018; WANG; YEUNG, 2017). O processo de solidificação ocorre devido à reação de dissolução de precipitação, onde há o crescimento e entrelaçamento dos cristais, elevando a resistência mecânica progressivamente em função do tempo, tendo como resultado um corpo sólido único formado por uma ou mais fases (GINEBRA *et al.*, 2018). O preparo e processo de endurecimento dos BFC é esquematizado pela Figura 3.

Para que possam ser utilizados na prática clínica, os BFC precisam apresentar algumas características físico-químicas específicas. Uma das principais características é o tempo de endurecimento, também chamado de tempo de pega ou cura. Este deve ser lento o suficiente para permitir a implantação, visto que a deformação durante o endurecimento pode causar rachaduras, mas rápido o suficiente para evitar atrasos na operação e infecções. O tempo de pega de muitos BFC é entre 15 e 22 min. Entretanto, esse tempo é muito longo para algumas aplicações clínicas, sendo necessário então reduzi-lo para 5-8 min. A viscosidade também é um

requisito importante, visto que dependendo da preferência do profissional e/ou da finalidade, biocimentos injetáveis ou moldados pelo operador poderão ser aplicados (ELIAZ; METOKI, 2017).

Figura 3 – Preparo e processo de endurecimento dos biocimentos de fosfato de cálcio.



Fonte: Adaptado de GINEBRA *et al.*, 2018

Os BFC por apresentarem composição extremamente similar ao da porção mineral do osso natural e características como fácil moldagem acompanhada de capacidade de endurecimento *in situ*, porosidade, eficácia ao serem utilizados como sistemas de *drug delivery*, encapsulando fármacos ou substâncias biológicas (fatores de crescimento, proteína morfogenética óssea), biocompatibilidade, biodegradação, osteoindução, osteocondução e injetabilidade são excelentes enxertos ósseos. Portanto, o desenvolvimento de novas aplicações e novas propriedades para esses biomateriais é de grande interesse de pesquisadores e profissionais da área (CHEN *et al.*, 2018).

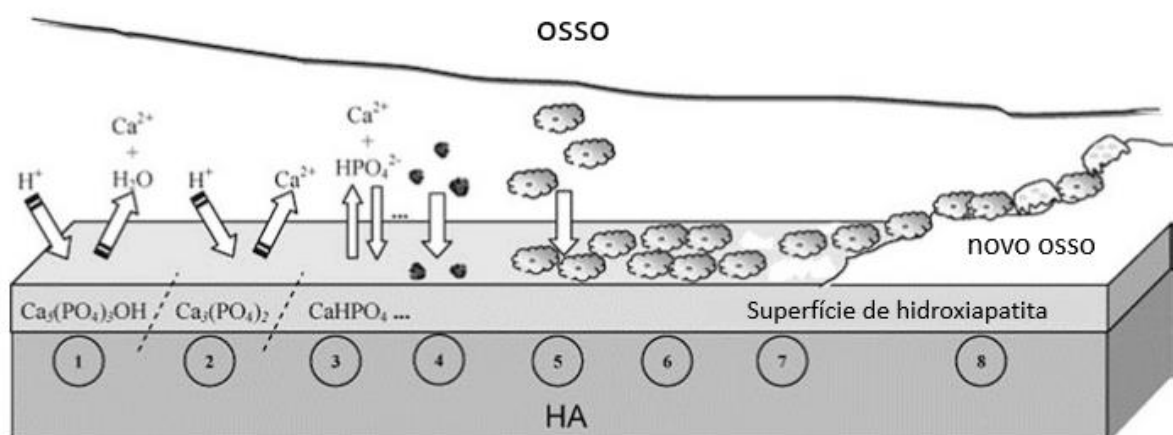
Os BFC são aplicáveis em vários cenários da área biomédica, principalmente em reparação óssea pós-traumática, cirurgia ou em ferimentos patológicos, como tumores osteolíticos ou osteoporose, e também para preenchimento de áreas do crânio e da região maxilo-facial que não sejam submetidos a grandes cargas mecânicas (VERRON; BOULER; GUICHEUX, 2012). Devido a sua injetabilidade e modelagem, o BFC também são amplamente utilizados em aplicações orais e dentárias, como preenchimento de canal radicular, pulpotomia e reparo de defeitos ósseos periodontais (CHEN *et al.*, 2018).

Assim como as biocerâmicas de fosfato de cálcio, os BFC não causam sinais de resposta inflamatória ou imunológica e possibilitam uma nova formação óssea. A reabsorção do material

pode ocorrer por dissolução com desintegração do cimento e formação de partículas seguida pela fagocitose das mesmas através de macrófagos. Em defeitos ósseos preenchidos por estes, ocorre uma nova formação óssea em contato direto com grânulos de fosfato de cálcio ainda não reabsorvidos. O crescimento ósseo também ocorre quando células semelhantes aos osteoclastos reabsorvem o BFC como se o mesmo fosse uma parte do osso, então um novo tecido ósseo é formado diretamente na linha de reabsorção (THEISS *et al.*, 2005; YUAN H, LI Y, DE BRUIJN JD, DE GROOT K, 2000).

BFC de HA e β -TCP possuem amplas aplicações no cenário ortopédico e odontológico (BROWN *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2018; LURYI; BULSARA; MICHAELIDES, 2017; STAVROPOULOS *et al.*, 2011; VERRET *et al.*, 2005). A HA é o fosfato de cálcio mais estável, porém com baixa solubilidade em ambiente fisiológico. Sua superfície favorece a nucleação de minerais ósseos nos fluidos corporais. Quando aplicados, não causam reações inflamatórias. Já o β -TCP é menos estável que a HA, mas possui uma taxa de degradação mais rápida e maior solubilidade. Além disso, possui uma alta taxa de reabsorção e é amplamente utilizada para aumentar a biocompatibilidade. β -TCP promove a proliferação de células osteoprecursoras como osteoblastos e células estromais da medula óssea (JEONG *et al.*, 2019). Portanto, devido a todas essas características, um biocimento que possuir ambas as fases em sua formulação possivelmente seriam mais eficazes em comparação aos outros. De fato, a literatura mostra que as composições bifásicas vêm apresentando melhor desempenho de neoformação óssea quando aplicados *in vivo* (SUNG *et al.*, 2004). A partir da Figura 4, é possível visualizar o mecanismo de regeneração do osso após aplicação de HA em um defeito ósseo.

Figura 4 – Mecanismo de regeneração do osso após aplicação de HA



Legenda: (1) início do procedimento de implante, onde começa uma solubilização da superfície da HA; (2) continuação da solubilização da superfície do HA; (3) o equilíbrio entre as soluções fisiológicas e a superfície modificada do HA foi alcançado (4) adsorção de proteínas e / ou outros compostos bioorgânicos; (5) adesão celular; (6) proliferação celular; (7) início de uma nova formação óssea; (8) novo osso formado.

2.5 Análise de citotoxicidade *in vitro* em biomateriais

Para serem utilizados na prática médica, os biomateriais precisam atender alguns requisitos básicos como: biocompatibilidade, biofuncionalidade e capacidade de induzir a formação de um novo tecido no indivíduo (GINEBRA *et al.*, 1996). A falta de biocompatibilidade, por exemplo, pode induzir interações imunológicas (locais e sistêmicas) que causem falha do dispositivo, sofrimento do paciente ou até fatalidade (OMIDI *et al.*, 2017). Portanto, o primeiro nível de teste, dentro da avaliação de biocompatibilidade de um biomaterial é a determinação da citotoxicidade *in vitro* (ISO 10993-5, 1992). Apesar de não dispensar a necessidade de análises *in vivo*, o modelo *in vitro* oferece resultados preliminares que permitem estudar os mecanismos pelos quais biomateriais podem ou não produzir reações adversas em nível celular, dando aos pesquisadores a oportunidade de realizar alterações na composição do material antes de prosseguir ao nível de teste *in vivo* (WENNBERG *et al.*, 1979).

O uso de modelos *in vitro* para avaliar a biocompatibilidade de dispositivos médicos possui muitas vantagens, entre elas a redução do tempo para os resultados, a capacidade prever possíveis toxicidades do material ao ambiente biológico e a capacidade de testar uma pequena quantidade em comparação com o estudo *in vivo* que é estimado pelos pesos corporais ou áreas de superfície (LIU *et al.*, 2018). Inúmeros métodos são descritos na literatura para realização de citotoxicidade entre eles estão os testes SRB, Alamar Blue, MTT, XTT, NRU, LDH (ASLANTÜRK, 2018).

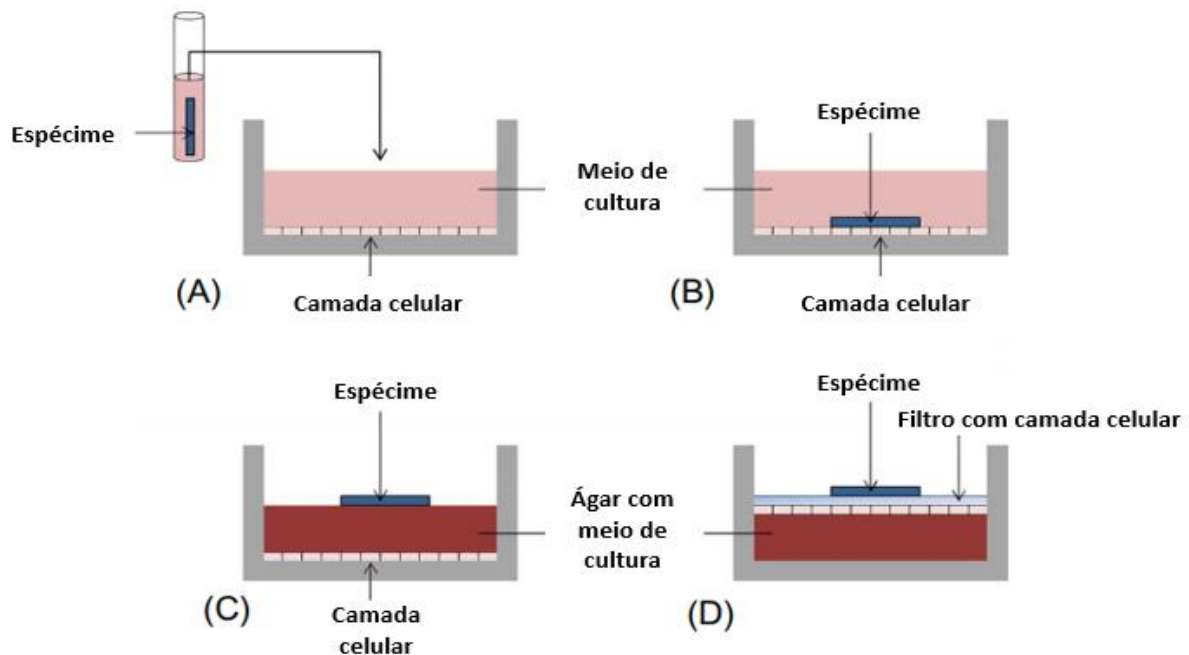
O ensaio da Sulforrodamina B (SRB) foi desenvolvido por SKEHAN e colaboradores (1990) e, desde então, é um dos métodos mais utilizados para avaliar a citotoxicidade *in vitro*. O princípio do método baseia na capacidade do corante SRB de se ligar aos componentes proteicos das células que foram fixadas às placas pelo ácido tricloroacético (TCA). O SRB é um corante aminoxanteno rosa brilhante que possui dois grupos sulfônicos que se ligam a resíduos de aminoácidos básicos em condições ácidas leves e se dissociam em condições básicas. Por se tratar de uma ligação estequiométrica, a quantidade de células coradas é diretamente proporcional à massa celular (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

Já o Alamar blue, nos últimos 50 anos, tem sido amplamente utilizado em análises

de viabilidade celular e citotoxicidade *in vitro*, portanto, é uma das substâncias mais referenciadas para estes ensaios. Este ensaio é capaz de monitorar o ambiente redutor de uma célula viável através da resazurina, a qual é um composto solúvel em água, estável em meio de cultura, não tóxico e permeável às membranas celulares. A resazurina é um corante azul não fluorescente que é reduzido ao resorufino através da atividade de enzimas redox, que por sua vez, tem cor rosa e é altamente fluorescente. As células viáveis convertem continuamente a resazurina em resorufina, gerando assim uma medida quantitativa da viabilidade celular. A mudança do estado oxidado para o reduzido permite flexibilidade de detecção, onde as medições podem ser quantitativas como leituras colorimétricas e/ou fluorométricas (mais sensíveis) ou qualitativas como uma mudança visível na cor indicando presença ou ausência de células viáveis (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018; RAMPERSAD, 2012).

Dependendo das propriedades material a ser analisado, algumas metodologias de citotoxicidade são mais recomendáveis que outras. A ISO 10993-5 recomenda os testes de contato direto, teste de contato indireto e teste de extração para a avaliação da citotoxicidade em biomateriais (GOLA, 2019), como é possível observar através da Figura 5.

Figura 5 – Testes baseados em cultura de células para avaliação de citotoxicidade em biomateriais.



Fonte: Adaptado de GOLA, 2019.

Legenda: (A) teste com extrato; (B) teste com contato direto; (C) teste com contato indireto: ensaio de difusão em ágar; (D) teste com contato indireto: ensaio de difusão do filtro.

3 JUSTIFICATIVA

Levando em consideração o grande número de casos que necessitam de enxertia óssea tanto em ortopedia como em odontologia, bem como a necessidade de encontrar biomateriais que possam substituir e superar as limitações dos enxertos ósseos tradicionais, é interessante o desenvolvimento de novos enxertos ósseos que possuam características similares ou superiores aos demais enxertos. Para isso, enxertos como as biocerâmicas fosfato de cálcio surgem como uma alternativa viável e vantajosa, visto que possuem composição similar ao da porção inorgânica do osso, são produzidos em laboratório, não aumentam a morbidade, nem oferecem o risco de doença e são disponíveis comercialmente. Além disso, estudos comprovam que esses enxertos podem apresentar as características de biocompatibilidade, osteocondução, osteoindução, além da capacidade de encapsular substâncias como fármacos e biomoléculas. Entre os fosfatos de cálcio sintéticos destacam-se a HA e β -TCP, ambos bastante utilizados em aplicações biomédicas devido as características de biocompatibilidade e qualidade ao promover o remodelamento ósseo. Consequentemente, estudos vem comprovando o excelente desempenho de biocêramicas de HA e β -TCP. Adicionalmente, devido a diferença da biodegradação de HA e β -TCP, é possível balancear fases mais estáveis e fases mais solúveis e controlar as propriedades de degradação do biomaterial *in vivo*. Entretanto, por serem disponíveis em blocos ou grãos, as biocerâmicas não preenchem completamente a cavidade do defeito crítico, além da possibilidade de evasão de partículas do material para outros tecidos do corpo, sendo necessário ainda a utilização de uma membrana de regeneração óssea guiada. Para superar essas limitações, BFC que possuíssem as fases HA e β -TCP trariam todas as vantagens das biocerâmicas de fosfato de cálcio que possuem ambas as fases, com adição das vantagens de BFC, como moldabilidade, capacidade de preenchimento total da cavidade formada pelo defeito crítico, injetabilidade e endurecimento *in situ*. A característica de endurecimento *in situ*, adicionalmente, pode vir a dispensar o uso de membranas de regeneração óssea guiada (membrana de colágeno), simplificando e diminuindo os custos do procedimento. Deste modo, a justificativa para a execução desse trabalho foi a necessidade de obter um novo BFC que possua em sua composição as fases Hidroxiapatita e β -TCP e que tenha as características ideais para serem introduzidos como alternativa aos demais enxertos em ortopedia e odontologia.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Obter BFC de HA e β -TCP que possuam características adequadas para aplicações na clínica ortopédica e odontológica.

4.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar os pós de fosfato de cálcio precursores dos BFC;
- Preparar e caracterizar os BFC após tempo de pega final;
- Realizar análises de pH e avaliação do tempo inicial e final de pega dos BFC;
- Analisar a citotoxicidade *in vitro* dos BFC obtidos;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho, duas metodologias diferentes foram utilizadas com o objetivo de obter BFC viáveis e que possuam as características adequadas para aplicações na clínica ortopédica e odontológica. Na primeira metodologia, os pós de fosfato de cálcio precursores do BFC I foram obtidos via reação no estado sólido. Já na segunda, os pós precursores do BFC II foram obtidos separadamente através da reação de precipitação em solução aquosa e via sol-gel. Ambos os pós precursores e BFC obtidos foram caracterizados por Difração de Raios X (DRX), tempo de pega, potencial hidrogeniônico (pH) e por análise de citotoxicidade. Devido a intenção de gerar uma patente a partir do invento obtido neste trabalho, alguns dados foram intencionalmente omitidos.

5.1 Síntese de pós de fosfato de cálcio via reação no estado sólido e preparação do BFC I

5.1.1 Síntese dos pós de fosfato de cálcio – Precursores do BFC I

A primeira rota de síntese proposta foi à reação de estado sólido, considerada um processo simples. Essa consiste, basicamente, na mistura mecânica dos materiais precursores de interesse, na forma de pó, com auxílio de moinhos (moinhos de bolas, atrito ou vibratório) ou almofariz com posterior tratamento térmico. Geralmente o tratamento térmico é realizado em altas temperaturas de sinterização e longos tempos de tratamento (calcinação), resultando em um pó altamente cristalino e homogêneo.

Quantidades estequiométricas dos precursores hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂, Sigma Aldrich, lote: MKBN3785V], com pureza de 95% e hidrogenofosfato de cálcio [CaHPO₄, Sigma Aldrich, lote: MKCC6144], com pureza de 98% foram pesadas (razão molar Ca/P = 2.5), misturadas e vigorosamente moídas para obtenção de um pó fino e homogêneo. A homogeneização do material foi feita em almofariz de ágata durante 10 minutos, em seguida o material foi sinterizado em temperatura de 1200 °C durante 1 hora, a uma taxa de aquecimento de 5°C/min em forno tipo Mufla. Após 1 hora, a amostra foi resfriada a temperatura ambiente e em seguida caracterizada por difração de raios X.

5.1.2 Preparação dos BFC I

O parâmetro utilizado na preparação do biocimento foi manual e visual, procurando-se obter uma pasta consistente que possibilitasse a moldagem do corpo de prova utilizando uma razão líquido/sólido (L/S) de 0,7.

O biocimento foi obtido adicionando à fração de aditivo correspondente a formulação a ser ensaiada [5% de CaHPO_4] em um almofariz de ágata contendo pó sintetizado e caracterizado [95% de HA/ β -TCP]. Logo após, realizou-se a homogeneização manual da mistura, com auxílio de uma espátula, para se obter a melhor dispersão e distribuição de CaHPO_4 na biocerâmica bifásica, por um período de tempo de 30 segundos. Em seguida, a mistura foi transferida para um béquer onde foi adicionado à solução de fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 4% (m/v). Após um minuto, o material resultante foi então transferido, com auxílio de uma espátula, para moldes de polímero Teflon® em formato de cilindros com 6mm de altura e 12 mm diâmetro, no qual permaneceram por 24 horas a temperatura ambiente até serem desmoldados, constituindo as pastilhas denominadas corpos de prova. Os corpos-de-prova foram desmoldados após 24 horas e analisados por difração de raios X, pH-Metro, aparelho de Vicat (tempo de pega) e citotoxicidade *in vitro*.

5.2 Síntese de pós de fosfato de cálcio via reação precipitação no meio aquoso e sol-gel e preparação do BFC II

5.2.1 Síntese dos Pós de Fosfato de Cálcio – Precursores sólidos do BFC II

Os reagentes que foram utilizados na síntese dos fosfatos de cálcio estão listados a seguir: Hidróxido de Cálcio - $\text{Ca}(\text{OH})_2$ PA (Merck, Lote: 38493147), Ácido Fosfórico (Orto) - H_3PO_4 – 85% (Merck, Lote: K39541273), Ácido Láctico - $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ – 95% (Merck, Lote: K40190566), Pirofosfato de Sódio – $\text{Na}_7\text{P}_2\text{O}_7$ – 100% (Synth), Hidróxido de Amônio - NH_4OH – 28 – 30% (Synth, Lote 125953).

Os pós de fosfato de cálcio, β -TCP e pirofosfato de cálcio (CPP), foram produzidos por precipitação em meio aquoso a partir de soluções de hidróxido de cálcio, ácido fosfórico e ácido láctico, que foram preparadas separadamente e deixadas sob agitação. Em um béquer contendo a solução de hidróxido de cálcio, foi adicionado ácido láctico. Em seguida, ácido fosfórico foi lentamente adicionado de modo a atingir vazão aproximadamente constante de 8 mL/min. Logo após, a mistura obtida foi mantida sob agitação constante à temperatura ambiente

durante o período de 1 hora. Hidróxido de amônia foi adicionado à solução para a precipitação de pós em pH 8 e em seguida envelhecida durante 24 horas. Ao término desse período, o precipitado foi filtrado em funil de Buchner em sistema de vácuo adicionando-se água deionizada para a retirada do excesso de NH_4OH . Os pós foram secos em estufa a 80°C por 24 horas e sinterizados em temperaturas de 1100°C durante 1 hora, a uma taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$, em forno mufla.

A HA foi sintetizada pelo método sol-gel a partir de soluções de hidróxido de cálcio e de ácido fosfórico. Em um béquer contendo a solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sob agitação constante, foi adicionada, lentamente, a solução de H_3PO_4 . A adição de ácido fosfórico foi controlada de modo a atingir vazão aproximadamente constante de $8 \text{ mL}/\text{min}$. Em seguida, a solução foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente durante 1 hora. As suspensões foram envelhecidas durante 24 horas. Ao término do período de envelhecimento, a solução foi submetida a um tratamento térmico para a formação do gel. O gel obtido foi seco em estufa a 80°C por 24 horas. Logo após, o material obtido foi então desaglomerado em almofariz de ágata e submetido a tratamento térmico. O processo de sinterização foi feito em um forno mufla a 1200°C por 2 horas a uma taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$.

5.2.2 Preparação dos BFC II

Os BFC II foram obtidos adicionando 10% de aditivo CPP em um almofariz de ágata contendo 60% de β -TCP e 30% de HA. Logo após, realizou-se a homogeneização manual, com auxílio de pistilo, para se obter a melhor dispersão e distribuição do material, por um período de tempo de 30 segundos. Em seguida, o material foi transferido para um becker onde foram adicionadas as soluções de ácido fosfórico e pirofosfato de sódio e misturados com auxílio de uma espátula durante 1 minuto (razão L/S = 0,75). Decorrido este tempo, a pasta resultante foi transferida para moldes de polímero Teflon[®] em formato de cilindros com 6 mm de altura e 12 mm de diâmetro. Os corpos-de-prova foram desmoldados após 24 horas e analisados por difração de raios X, pH-Metro, análise do tempo de pega e citotoxicidade *in vitro*.

5.3 Análise por difração de raios X (DRX)

Os pós de fosfato de cálcio precursores, bem como os corpos-de-prova moldados a partir dos dois biocimentos obtidos (BFC I e BFC II) foram submetidos à caracterização por

difração de raios X a fim de identificar as fases presentes no material. A técnica não altera as características do material e foi realizada a partir de um difratômetro Philips X'Pert X-ray Diffraction System com tubo de cobre θ - 2θ com $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,1542$ nm) operando com uma voltagem de 40 KV e uma corrente de 40 mA. Os difratogramas foram obtidos varrendo a faixa de 20° - 60° .

5.4 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

Para analisar o pH dos corpos-de-prova após reação de pega, esses foram submersos em um béquer contendo água deionizada à temperatura constante de 37° a partir de uma relação de líquido para sólido de 10:1. Os corpos-de-prova foram mantidos no béquer por tempo de 24h, posteriormente, foi determinado o pH através de um pH-Metro digital da QUIMIS, modelo Q-400A.

5.5 Tempo de Pega

Os tempos de pega inicial e final dos biocimentos foram determinados em um aparelho de Vicat modificado, com base na norma NBR 12128. Nesta técnica, a mistura recém homogeneizada é vertida em um recipiente e colocada com a placa base no aparelho de Vicat modificado, situado sob o tronco cônico. Foi anotado o tempo contado a partir do instante em que o líquido e o pó entra em contato. O tronco cônico foi descido suavemente até a superfície da pasta no molde. Logo após, era solto em intervalos de tempo crescentes. No momento em que sua ponta ativa deixava de penetrar totalmente na pasta, foi anotado o tempo. O próximo estágio no processo de pega foi medido vertendo o molde cheio sobre a placa base, de forma que os ensaios para a determinação do fim de pega fossem realizados na face oposta do corpo-de-prova, que estava originalmente em contato com a placa base. Em seguida, o tempo foi anotado. Para a realização das medidas, foi utilizado o procedimento descrito acima. O tempo final do processo foi considerado como aquele em que o tronco cônico deixou somente marcas ligeiramente perceptíveis na superfície da peça cerâmica.

5.6 Análise da Citotoxicidade *in vitro* do BFC I – Método SRB

5.6.1 Preparação das amostras para ensaio *in vitro*

Para realização do ensaio de citotoxicidade *in vitro*, 50 mg do BFC I em pó foi submetido à esterilização pelo método de irradiação ultravioleta por 30 min antes de serem incluídas nos ensaios. A amostra foi parcialmente solubilizada no meio DMEM à fim de se obter uma concentração de 2 mg/mL do pó de BFC I no meio, sequencialmente, uma diluição seriada fator 2 foi realizada até a concentração final de 0,625 mg/mL.

5.6.2 Cultivo celular

As células de fibroblastos murinos utilizadas na avaliação são da linhagem NCTC clone 929 [L CELL, L-929], de origem de tecido conectivo adiposo, adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em garrafas estéreis com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®) e com penicilina 10.000 u/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL (Gibco®) e mantidas em estufa sob atmosfera contendo 5% de CO₂ à temperatura de 37°C.

5.6.3 Citotoxicidade *in vitro* pelo método da Sulforodamina B

A citotoxicidade de fibroblastos L929 foi avaliada pelo ensaio sulforodamina B, que consiste na ligação de aminoácidos presentes nas células ao corante aminoxantina (SRB) (TAKUATHUNG *et al.*, 2017).

As células L929 foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 2×10^4 células/mL e incubadas a 37 ° C durante 24 h. As células foram tratadas com (62,50 – 2000 µg/mL) de BFC I por 72 horas. Posteriormente a incubação, as células foram fixadas com 100 µL de ácido tricloroacético 10% por 1 h, em seguida foram incubadas com 100 µL de SRB a 0,057% durante 30 min. O corante não ligado foi removido por lavagem e o corante ligado a proteína foi solubilizado com 200 µL de tampão tris base 10 mM (pH 10,5) e a absorbância a 570 nm foi determinada utilizando o leitor de microplacas (Asys Expert Plus). Após leitura das absorbâncias, a viabilidade celular foi obtida a partir da seguinte equação matemática:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{ODx \times 100}{ODDMEM}$$

Onde:

ODx: Densidade óptica medida em cada poço dos grupos experimentais

ODDMEM: Densidade óptica média do grupo controle (DMEM)

O experimento foi realizado em duplicata, sendo que para cada experimento, os grupos experimentais continham 3 poços cada. Os resultados foram analisados através do programa GraphPad Prism (Graphpad Prism Software Versão 8.3.0), através da análise de variância *one-way* ANOVA ($p < 0,05$) com pós-teste de Dunnett.

5.7 Análise da Citotoxicidade *in vitro* do BFC II – Método Alamar Blue

5.7.1 Preparação do extrato para ensaio *in vitro*

Para realização do ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi realizado um extrato do BFC II de acordo com as normas da ISO 10993-5 que determina as técnicas para obtenção do extrato líquido de materiais. Para isso, um corpo de prova de 7 mm de diâmetro e 4 mm de altura foi moldado e após 24 horas foi submetido a esterilização por autoclavagem (121 °C por 15 min) dentro de um microtubo. Após a esterilização, 1,2 mL do meio DMEM suplementado foi inserido dentro do tubo estéril com o biocimento, mantendo uma relação área de superfície por volume de 1,25 cm²/mL de acordo com especificações da ISO 10993-12. Por fim, para obtenção do extrato, o corpo de prova permaneceu incubado com o meio DMEM por 72 horas em estufa sob atmosfera contendo 5% de CO₂ à temperatura de 37°C.

5.7.2 Cultivo celular

Na avaliação, foram utilizadas células osteoblásticas da linhagem OFCOL II, de origem da medula óssea de camundongos, adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em garrafas estéreis com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®) e com

penicilina 10.000 u/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL (Gibco®) e mantidas em estufa sob atmosfera contendo 5% de CO₂ à temperatura de 37°C.

5.7.3 Citotoxicidade *in vitro* pelo método Alamar Blue

A avaliação da viabilidade celular foi determinada pelo método da Alamar Blue que tem como princípio básico as propriedades físico-químicas do indicador resazurina. Os grupos experimentais foram representados pelo grupo controle negativo (DMEM) contendo apenas o meio DMEM, grupos que receberam tratamento com diferentes volumes do biocimento (10, 20, 40, 80 µL).

As células osteoblásticas foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 4×10^4 células/mL e incubadas a 37 ° C durante 24h. As células foram tratadas com 10, 20, 40 e 80 µL do extrato do biocimento e novamente incubadas por 72 horas. Posteriormente a incubação 10% da solução de Alamar Blue® em uma concentração de 10% em relação ao volume dos meios DMEM presente nos poços (v/v) conforme recomendações do fabricante (Alamar Blue® Cell Viability Reagent). As leituras foram realizadas após 3 horas de incubação a partir de um leitor de fluorescência DTX 880 – Multimode Detector. Os resultados foram analisados após leitura das fluorescências, a viabilidade celular foi obtida a partir da seguinte equação matemática:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Fx \times 100}{FDMEM}$$

Onde:

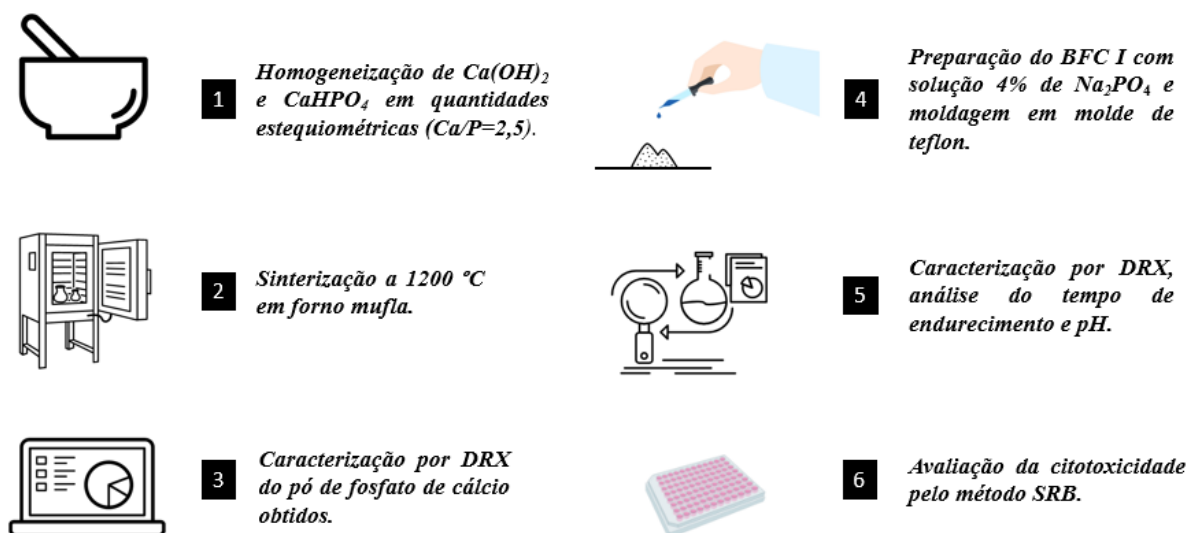
Fx: Fluorescência medida em cada poço dos grupos experimentais

FDMEM: Fluorescência média do grupo controle (DMEM)

O experimento foi realizado em triplicata, sendo que, para cada experimento, os grupos experimentais continham 3 poços cada. e os resultados foram analisados através do programa GraphPad Prism (Graphpad Prism Software Versão 8.3.0), através da análise de variância *one-way* ANOVA ($p < 0,05$) com pós-teste de Dunnett.

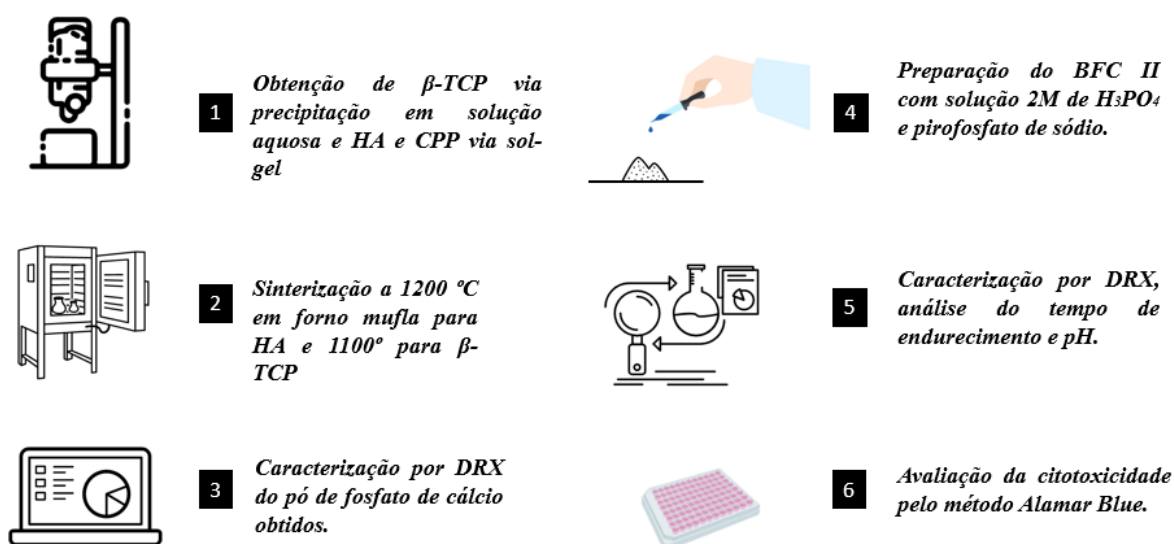
As figuras 6 e 7 esquematizam toda metodologia de obtenção e caracterização físico-química e biológica, tanto do BFC I, como do BFC II.

Figura 6 – Esquema da metodologia de obtenção e caracterização do BFC I



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 7 – Esquema da metodologia de obtenção e caracterização do BFC II



Fonte: elaborado pela autora (2019)

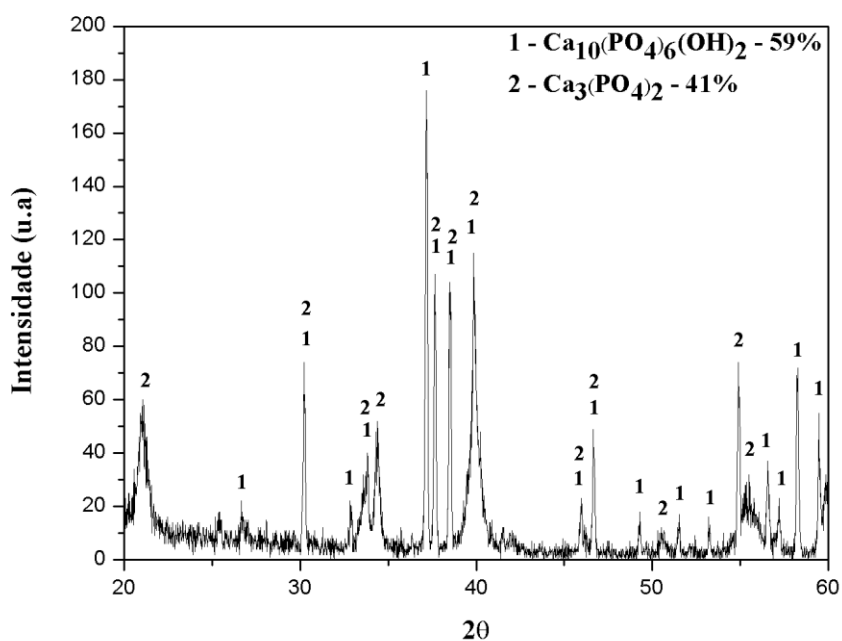
6 RESULTADOS

6.1 Caracterização do precursor sólido e do BFC I

6.1.2 Análise por difração de raios X

Os difratogramas de raios X do pó e do BFC I após a reação de pega são apresentados nas figuras 8 e 9, que mostram os resultados da análise qualitativa e semi-quantitativa das fases presentes.

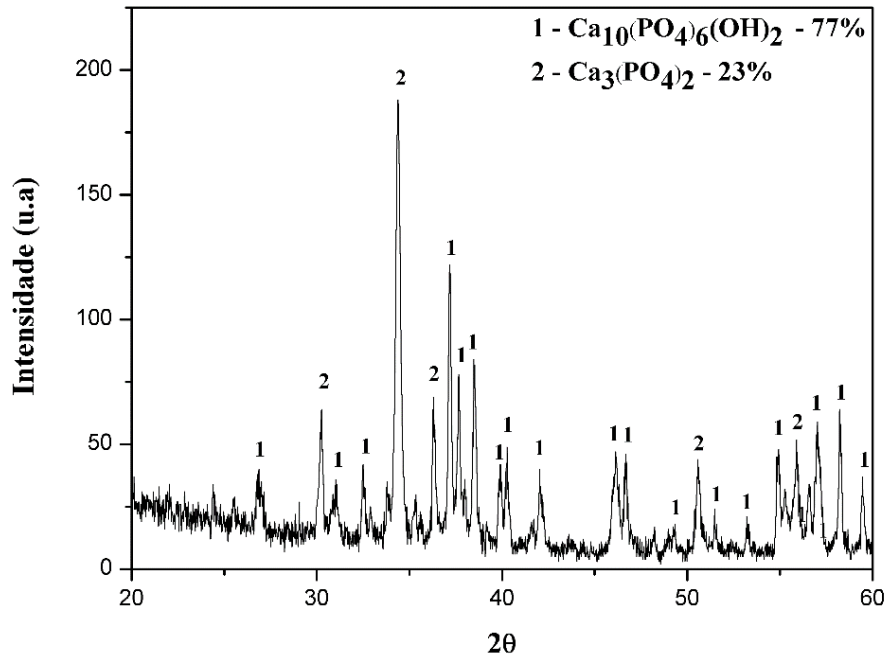
Figura 8 – Difratograma de raios X do pó de fosfato de cálcio bifásico precursor do BFC I.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Legenda: difratograma de raios X determinado as fases obtidas através da síntese da biomecânica via estado sólido. Os picos representados pelo número 1 são referentes à fase HA, já os picos representados pelo número 2 são referentes a fase β -TCP.

Figura 9 – Difratoograma de raios X do BFC I.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Legenda: difratograma de raios X determinado as fases obtidas após a preparação do BFC I. Os picos representados pelo número 1 são referentes à fase HA, já os picos representados pelo número 2 são referentes a fase β -TCP. É possível notar que a quantidade da fase HA aumentou após hidratação com a fase líquida (Na_2PO_4).

No difratograma do pó sintetizado via reação em estado sólido (Figura 8) foram identificados os picos referentes às fases HA, na composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com estrutura cristalina hexagonal e plano principal de difração [1 2 1] como fase majoritária, ficha cristalográfica JCPDS: 084-1998 e a fase β -TCP na composição $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, ficha cristalográfica JCPDS: 070-2065, indicando a formação do material biocerâmico bifásico.

O resultado obtido sobre o BFC I revelou também em seu difratograma de raios X os picos representativos da fase fosfato β -TCP na composição $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (JCPDS: 070-2065) e da fase HA na composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (JCPDS: 084-1998) como pode ser observado na Figura 9.

6.1.3 Tempo de Pega e Potencial de Hidrogênio (pH)

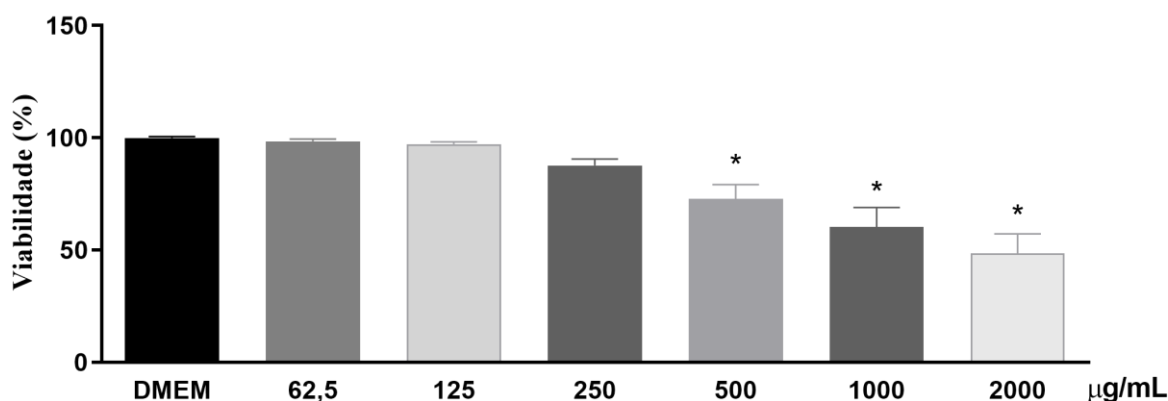
Com relação ao tempo de pega, constatou-se que a amostra apresentou uma média tempo de pega inicial de 6 minutos e tempo final de 20 minutos. Com relação ao pH, a partir do resultado obtido da análise, pode-se verificar um valor de pH igual a 7,6.

6.1.4 Citotoxicidade *in vitro* pelo método da Sulforodamina B

A avaliação da viabilidade celular foi determinada pelo método da Sulforodamina B. Os grupos experimentais foram representados pelo grupo controle negativo (DMEM) contendo apenas o meio DMEM, grupos que receberam tratamento com diferentes concentrações do BFC I (62,50 – 2000 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos como percentual de viabilidade celular (%) em comparação ao grupo DMEM.

De acordo com a Figura 10 é possível observar que concentrações até 250 $\mu\text{g/mL}$ do BFC I não apresentarem diferenças estatísticas significantes em comparação ao grupo controle, portanto, não inibiram o crescimento celular. A partir da análise por microscopia de contraste de fase (Figura 11) é possível observar que a exposição das células em contato direto com concentrações até de 500 $\mu\text{g/mL}$.

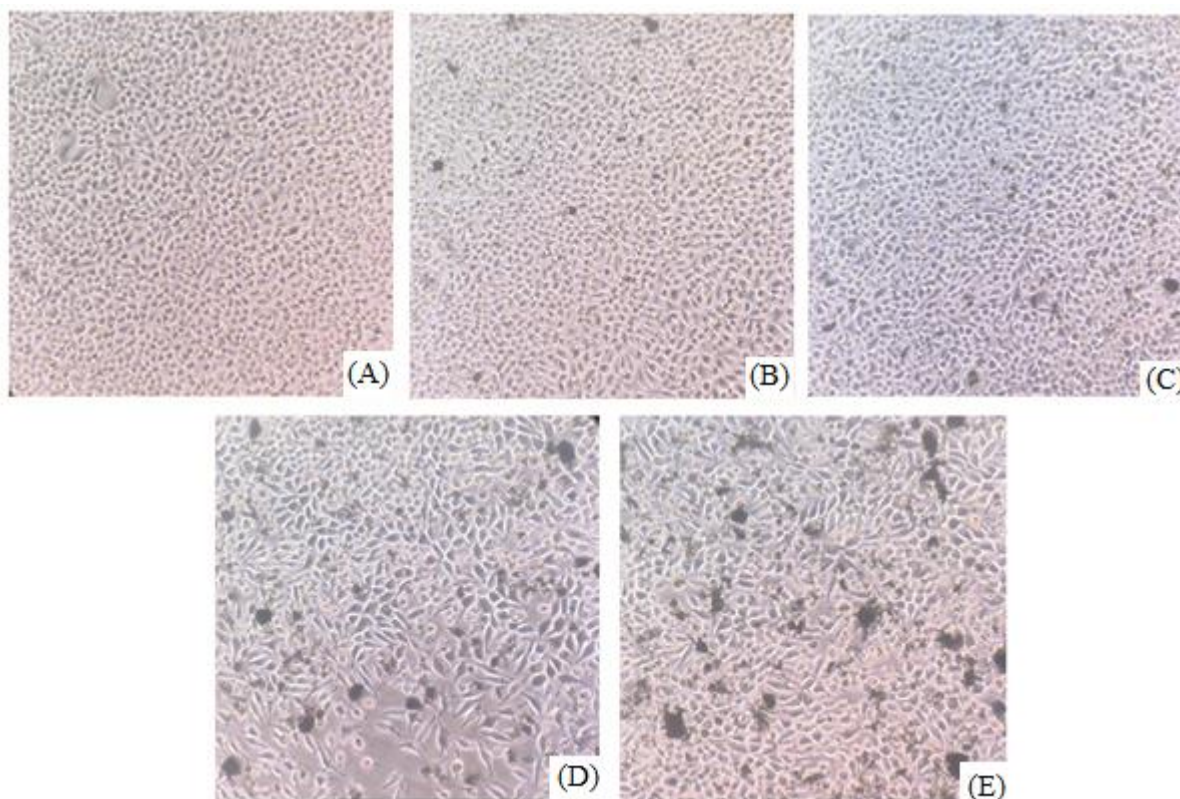
Figura 10 – Viabilidade celular em células L929 em contato direto com diferentes concentrações de BFC I.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Legenda: As barras representam a média \pm E.P.M viabilidade (%) celular de fibroblastos murinos (L929) em contato com diferentes concentrações BFC (62,5 - 2000 $\mu\text{g/mL}$). O grupo controle foi exposto somente ao meio de cultura suplementado (DMEM). * $p < 0,05$ versus DMEM (ANOVA seguido de teste de Dunnett).

Figura 11 – Fotomicrografias de células L929 em cultura expostas a diferentes concentrações de BFC I



Fonte: elaborado pela autora (2019)

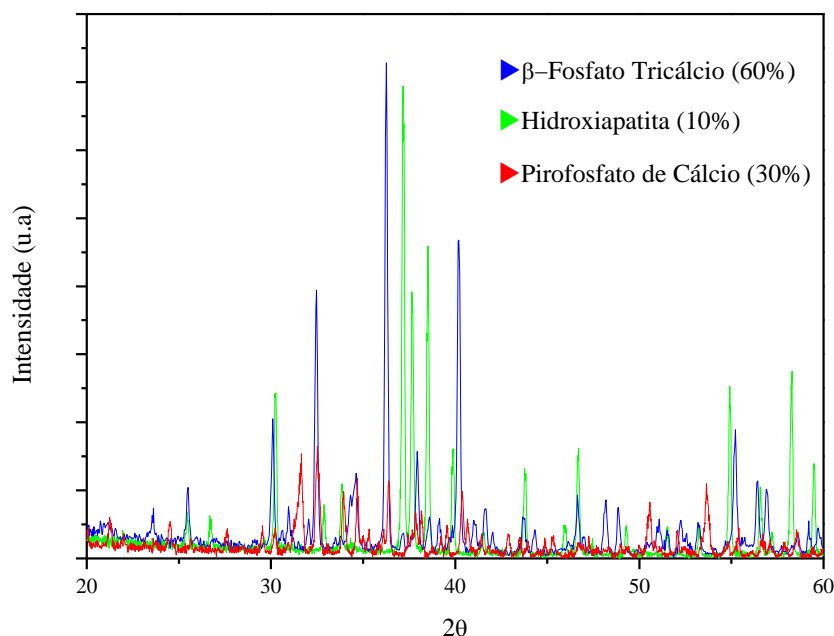
Legenda: Microscopia de contraste de fase após 72 horas de exposição ao BFC I em diferentes concentrações (x100). (A) Células do grupo DMEM (C-); (B) Células expostas a 62,5 µg/mL de BFC I; (C) Células expostas a 125 µg/mL de BFC I; (D) Células expostas a 250 µg/mL de BFC I; (E) Células expostas a 500 µg/mL de BFC I. As camadas mais escuras das imagens ilustram o BFC I no meio.

6.2 Caracterização do precursor sólido e do BFC II

6.2.1 Análise por difração de raios X

Os difratogramas de raios X da mistura de fosfatos de cálcio e do BFC II são apresentados nas Figuras 11 e 12 que mostram as análises qualitativas e semi-quantitativas das fases presentes.

Figura 12 – Difratoograma de raios X do pó de fosfato de cálcio precursor do BFC II



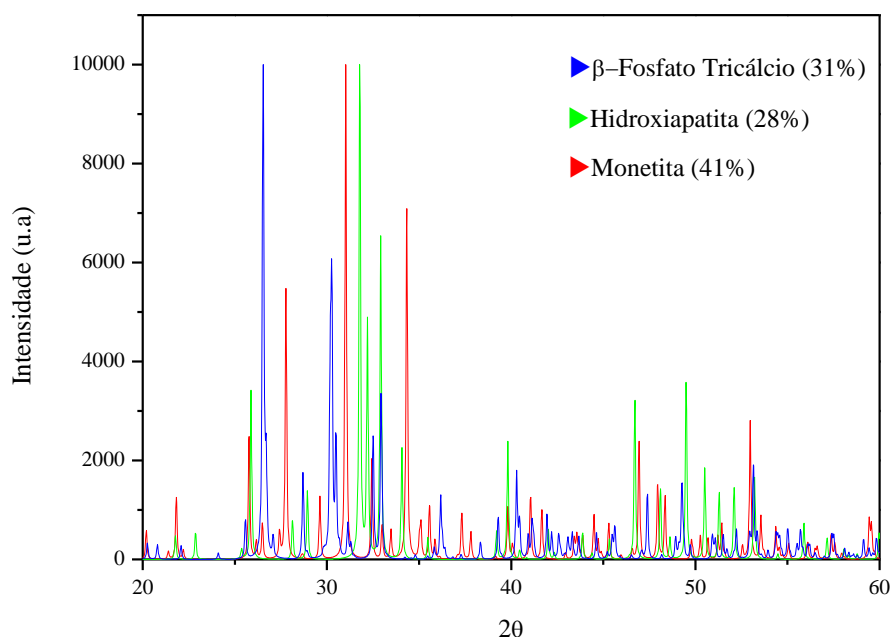
Fonte: elaborada pela própria autora (2019)

Legenda: O difratograma de raios X determinando as fases obtidas através da síntese via reação de precipitação no estado aquoso e via sol-gel. Os picos representados pela cor azul são referentes a fase β -TCP; Os representados pela cor verde são referentes à fase HA; O CPP é representado pela cor vermelha.

Os resultados de caracterização obtidos pela difratometria de raios X realizado sobre mistura dos pós revelou em seu espectro (Figura 12) picos bem definidos referentes às fases β -Fosfato de Tricálcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], ficha cristalográfica 070-2065 JCPDS, fase HA [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] de ficha cristalográfica 009-0432 JCPDS e a fase pirofosfato de cálcio [$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$], ficha cristalográfica 009-0345 JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

Já o difratograma de raios X do BFC II após a reação de pega é apresentado na Figura 13, que mostra os resultados da análise das fases presentes. No difratograma foram identificados os picos referentes às fases β -TCP, ficha cristalográfica JCPDS: 070-2065, a fase HA, ficha cristalográfica 009-0432 JCPDS e a fase Monetita [CaHPO_4].

Figura 13 – Difratoograma de raios X do BFC II



Fonte: elaborado pela própria autora (2019)

Legenda: O difratograma de raios X do BFC II determinando as fases obtidas após a reação de pega. Os picos representados pela cor azul são referentes a fase β -TCP e os picos representados pela cor verde são referentes à fase HA, já os picos representados pela cor vermelha são referentes à fase monetita.

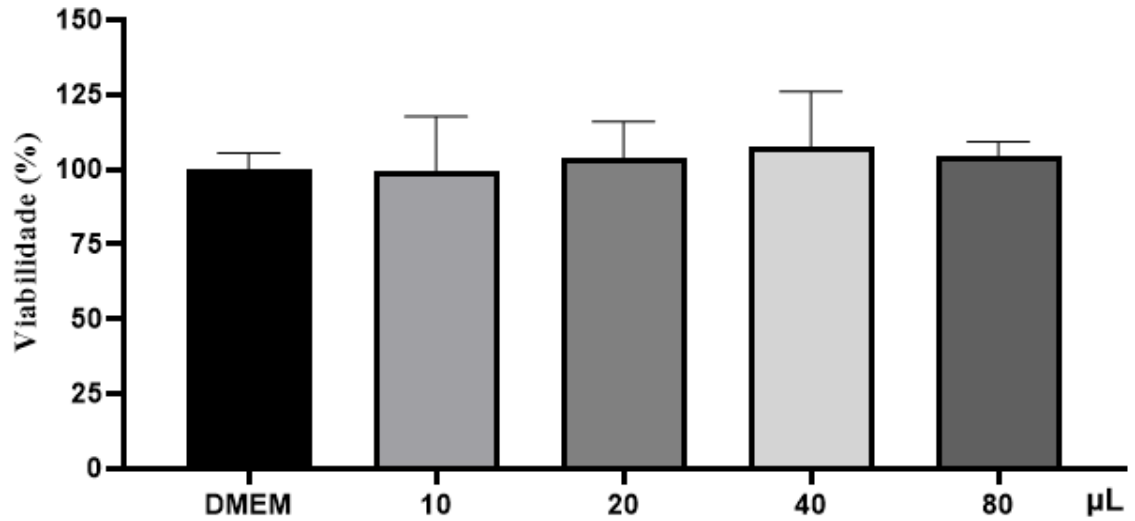
6.2.2 Tempo de Pega e Potencial de Hidrogênio (pH)

Com relação ao tempo de pega, constatou-se que a amostra apresentou uma média tempo de pega inicial de 3 minutos e tempo final de 7 minutos. Com relação ao pH, a partir do resultado obtido da análise, pode-se verificar um valor de pH igual a 7,0.

6.2.3 Citotoxicidade *in vitro* pelo método da Alamar Blue

Os resultados da análise de citotoxicidade pelo método Alamar Blue foram expressos como percentual de viabilidade célula em comparação ao grupo controle (DMEM). A Figura 14 apresenta o gráfico com valores de inibição de crescimento das células nos diferentes grupos experimentais. Em todos os grupos experimentais contendo extrato do BFC II, as viabilidades celulares foram equivalentes às do grupo controle, o qual continha apenas o meio de cultura DMEM suplementado.

Figura 14 – Viabilidade celular em células OFCOLII em contato indireto com diferentes volumes de extrato do BFC II



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Legenda: As barras representam a média \pm E.P.M viabilidade (%) celular de osteoblastos murinos (OFCOLII) em contato com diferentes volumes BFC II (10 - 80 μ L; v/v). O grupo controle foi exposto somente ao meio de cultura suplementado (DMEM) (ANOVA seguido de teste de Dunnett).

7 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, foi possível sintetizar pós de fosfato de cálcio precursores para obter BFC que possua em sua composição as fases HA e β -TCP e que demonstraram biocompatibilidade *in vitro* e que possuem características físico-químicas ideais para aplicações biomédicas. As fases de HA e β -TCP foram almeçadas para compor o material devido sua ampla utilização como substitutos ósseos já que possuem similaridades ao mineral ósseo, excelente biocompatibilidade, propriedades de osteogênese e a capacidade de formar fortes ligações com o tecido ósseo do hospedeiro (DOROZHKIN, 2012).

A HA apresenta composição e estrutura cristalográfica similar à fase mineral dos ossos e dentes, contém cerca de 90% de todo o cálcio do corpo humano. As suas principais vantagens são a sua biocompatibilidade, osteocondutividade, lenta biodegradabilidade, origem sintética (baixo risco de transmissão de doenças), baixa imunogenicidade (POINERN *et al.*, 2009). Devido a essa similaridade, a HA estequiométrica, se apresenta promissora em aplicações biomédicas, por favorecer a junção das células de osteoblastos em sua superfície, e assim promover uma melhor dissolução e adsorção de íons Ca^{++} e P, quando aplicada em meios biológicos naturais ou simulados (VALDES, 1995).

O β -TCP é de grande importância na área de biomateriais. É utilizado no preenchimento de defeitos e extensão de contornos do tecido ósseo (BILLOTTE, 2000). Sua importância se deve, também, ao fato de este ser um dos precursores melhor sucedidos na síntese de HA, além de ser empregado, em certos casos, em misturas bioativas de estímulo ao crescimento ósseo (KWON *et al.*, 2003).

Além disso, com relação à degradação, a reabsorção do β -TCP no organismo é muito maior que o da HA, portanto, a partir de biocimento contendo ambas as fases, é possível balancear uma fase mais estável com uma fase mais solúvel e controlar as propriedades de degradação do biomaterial de acordo com o tempo de nova formação óssea (DOROZHKIN, 2012). Estudos também afirmam que a mistura de HA com fosfatos tricálcio possuem uma maior capacidade de osteoindução quando aplicados *in vivo* (SAMAVEDI; WHITTINGTON; GOLDSTEIN, 2013)

Portanto, tendo em vista que os pós de fosfato de cálcio precursores dos BFC podem ser sintetizados a partir de diferentes metodologias, as quais envolvem reações em estado úmido, sólido, via sol-gel e hidrotérmica (BOSE; TARAFDER, 2012; OSAKA *et al.*, 1991; RAYNAUD *et al.*, 2002), a primeira metodologia proposta foi a de reação no estado sólido. Esta foi escolhida por ser uma rota sintética considerada um processo simples, de custo

significativamente baixo e maior rentabilidade (SEGAL, 1997), visto que é de interesse a obtenção de um material viável capaz de ser comercializado, ou seja, produzido em larga escala.

Através do método de reação de estado sólido foram obtidas biocerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas, apresentado uma relação de 59% de HA e 41% de β -TCP. Esse foi um feito inédito, pois não existem estudos que comprovem a obtenção de biocerâmicas bifásicas por meio deste método. O difratograma de raios X do BFC I demonstrou os picos representativos da fase β -TCP na composição $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e da fase HA na composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com estruturas cristalinas romboédrica e hexagonal e identificados pela ficha 70-2065 JCPDS e 84-1998 JCPDS, respectivamente. Com o uso do programa X'Pert Highscore Plus (análise semi-quantitativa) determinaram-se as quantidades relativas das fases presentes para o BFC I. Observou-se uma relação da ordem de 23% de β -TCP e 77% de HA e também uma redução da intensidade dos picos de difração, indicando que houve uma modificação superficial dos cristais de biocimento quando em presença da solução de 4% de Na_2HPO_4 , mas não se observou modificação de fase. Também foi observado um aumento em percentagem em relação a fase HA e uma diminuição em percentagem da fase β -TCP. Isso, provavelmente, se deve a presença do aditivo (CaHPO_4) que favoreceu a precipitação da fase de HA em maior quantidade.

Com o sucesso na obtenção das fases, o primeiro BFC I foi submetido à caracterização físico-química, determinando assim, o tempo de pega e o potencial hidrogeniônico (pH).

O principal desafio na preparação dos BFC foi à determinação adequada de uma relação líquido/pó que não comprometesse a pega do BFC. O tempo de pega é um parâmetro fundamental para determinar a aplicação de BFC. Sua avaliação foi empírica, sendo realizada através da verificação se o tempo de pega do BFC estabeleceu-se num período de tempo superior ou inferior ao relatado na literatura. O BFC I apresentou tempo de pega final de 20 min, adequado para algumas aplicações ortopédicas (DRIESENS *et al.*, 1993). VERLAAN e colaboradores (2005) afirmam que o tempo para que o BFC endureça o suficiente para permitir uma mobilização cuidadosa de um paciente varia muito com a estrutura química e a temperatura de preparação inicial, mas geralmente é de 15 a 45 minutos em ambiente clínico.

Com relação ao pH foi possível determinar o pH em torno de 7,6 para amostras de BFC I. Para que possam ser utilizados na clínica, os biocimentos precisam ter o pH entre 6,5 e 8 (DRIESENS *et al.*, 1997). Portanto, segundo DRIESENS e colaboradores (1997), com relação ao pH, o BFC I está adequado. Entretanto, recentemente, estudos *in vitro* realizado por GALLOW e colaboradores (2017) demonstraram que o desenvolvimento de osteoblastos foi

melhor em pH ótimo em torno de 8,4, sugerindo uma possível utilidade terapêutica do pH elevado em regeneração óssea. Já o pH ácido é responsável por vários danos à saúde que afetam tanto o metabolismo, além de favorecer a desmineralização óssea (D. A. BUSHINSKY, 1989; DAVID A. BUSHINSKY, 2001).

Com relação a avaliação da citotoxicidade *in vitro*, o biocimento não se mostrou citotóxico às células de fibroblastos murinos linhagem L929. Ao analisar os resultados foi possível perceber uma inibição a partir da concentração de 500 µg/mL, chegando a uma inibição de aproximadamente 52% da concentração de 2000 µg/mL, entretanto, através de imagens de microscopia de fase, foi possível observar que concentrações a partir de 500 µg/mL são altas o suficiente para impedir fisicamente o crescimento celular, pois é possível visualizar células morfológicamente normais e viáveis próximas as porções de BFC I. Adicionalmente, um estudo realizado por TANG, LI, EKSTRAND & LIU (1999), demonstrou que o contato direto apesar de simular melhor o que acontece *in vivo*, também é capaz de atuar matando as células devido a sensibilidade do ambiente *in vitro*. Portanto, o comportamento inibitório, possivelmente, não ocorreu devido a uma toxicidade do BFC I em relação a células de fibroblastos. De acordo com OLKOWSKI e colaboradores (2015) é possível que o contato direto das células com o material também seja capaz de resultar na fagocitose de partículas cerâmicas liberadas pelo biocimento, ocasionando a morte celular, além disso, a concentração exacerbada de íons cálcio devido a maiores quantidades de material no meio também é capaz de resultar em morte celular. Entretanto, isso não deve ser interpretado como uma propriedade negativa do biomaterial, visto que ocorre somente devido a fragilidade do ambiente *in vitro*.

A hipótese de que o BFC não é citotóxico também se baseia em estudos do comportamento *in vitro* de outros biocimentos que comprovaram a biocompatibilidade de materiais semelhantes ao BFC I. LIU *et al.* (1997), por exemplo, obtiveram resultados que, além de confirmarem a não toxicidade de BFC de HA, demonstraram que extratos desse biomaterial não possuem potencial mutagênico ou carcinogênico. Posteriormente, ALCAIDE *et al.* (2008), estudaram a viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) em contato com discos de biocimento e observaram que, apesar da diminuição da viabilidade após incubação de 2 dias, houve estímulo significativo do crescimento celular após 7 dias. Adicionalmente, KIM e colaboradores (2010) estudaram os efeitos de uma biocerâmica composta por β -TCP na viabilidade de fibroblastos murinos e constataram que essa se manteve acima de 75% quando as células foram expostas a consideráveis concentrações do material.

Entretanto, apesar da interpretação dos resultados e sua comparação com dados da literatura resultarem na conclusão de que o BFC I não exerceu uma toxicidade nas células L929,

outros experimentos deverão ser realizados para confirmar essa afirmação como, por exemplo, ensaio de citotoxicidade a partir do extrato do BFC I.

Apesar da inovação e de ser um material promissor para algumas aplicações na ortopedia, o tempo de pega final do BFC I não o torna adequado para aplicações na odontologia, pois é desejável que o tempo de pega permita a manipulação e aplicação do material no defeito crítico, mas que também seja rápido o suficiente para diminuir o tempo de exposição do tecido aberto com o ambiente e consequentemente evitar contaminação bacteriana (EDDY *et al.*, 2018; ALONSO, 2011). Além disso, em cirurgias periapicais, por exemplo, o risco de lavagem pelo fluxo sanguíneo é alto, portanto, várias aplicações clínicas requerem tempos curtos - de 3 a 10 minutos ou menos (PRATI; GANDOLFI, 2015).

Visando a obtenção de um BFC que apresentasse um tempo de pega final que o tornasse aplicável na odontologia, a primeira tentativa de diminuir esse tempo foi reduzindo a razão líquido/sólido (L/S). Com isso, repetidos testes empíricos foram realizados para determinar qual razão L/S seria viável para diminuir o tempo de pega ao mesmo tempo que mantém uma boa plasticidade para moldagem. Entretanto, como resultado, observou-se que a razão L/S de 0,35, que resultou no tempo de pega que queríamos atingir (até 10 minutos), não foi capaz de formar uma pasta moldável, sendo assim inviável para aplicações biomédicas, pois uma das grandes vantagens dos BFC é possuir boa moldabilidade capaz de permitir o preenchimento de toda a cavidade do defeito ósseo. Outro parâmetro que foi modificado para tentar diminuir o tempo de pega foi o tamanho da partícula ao passar o pó bifásico em uma peneira granulométrica com malha de 500 μm antes do preparo do BFC. Entretanto, essa alteração também não resultou em uma pasta moldável capaz de endurecer em menos de 10 minutos.

GALLINETTI e colaboradores (2014), ao tentarem produzir um biocimento bifásico de HA com β -TCP a partir da hidratação de pós contendo α -TCP e β -TCP com uma solução de fosfato dissódico, semelhante a que utilizamos, encontraram que a fase β -TCP, apesar de não influenciar o tempo de pega inicial, retardou consideravelmente o tempo de pega final. Uma possível hipótese para o longo tempo de pega é que este se deu devido a baixa reatividade da fase β -TCP. Portanto, provavelmente, a fase líquida utilizada para preparação do BFC I, a solução de fosfato dissódico a 4% (m/v), com pH de aproximadamente 7,4, não foi capaz fazer com que o β -TCP reagisse completamente. Segundo FERNÁNDEZ e colaboradores (1999) o pH do BFC é o principal fator controlador das concentrações de Ca e P na solução de cimento, afetando as taxas da reação de pega.

Conseqüentemente, alterações na metodologia foram necessárias para que o tempo de pega fosse reduzido. Com isso, a fase líquida do BFC I foi alterada para uma solução de ácido fosfórico 2 M que favoreceria a reação do por β -TCP, acelerando o tempo de pega. Para isso, é interessante que a fase β -TCP predomine na razão β -TCP/HA, visto que foi observada uma reação exotérmica ao misturar o pó contendo maiores quantidades de HA em contato com a solução. Essa reação poderia modificar propriedades do material como pH, resistência mecânica e até ocasionar uma reação imunológica após implantação no corpo humano. Com isso, foi necessária uma alteração na rota sintética dos pós de fosfato de cálcio, visto que, apesar das vantagens da reação no estado sólido, está possui a desvantagem de não permitir o controle das fases formadas devido a desvios estequiométricos durante a reação (SEGAL, 1997). Sendo assim, um outro BFC, denominado BFC II, foi obtido.

As rotas sintéticas escolhidas para produzir os precursores do BFC II foram as de precipitação em estado aquoso e via sol-gel. Essas rotas foram escolhidas devido a possibilidade de controle de parâmetros para obter um produto de elevada pureza (SANTOS, 2005; FARZADI *et al.*, 2001; ALVES CARDOSO, JANSEN, & G. LEEUWENBURGH, 2012). A partir do método de difração de raios X foi possível confirmar a obtenção das fases de HA e β -TCP pelas metodologias escolhidas.

A partir dos pós obtidos, o principal desafio na preparação do BFC II foi a determinação adequada de uma relação L/S que não comprometesse a pega do biocimento. Visto que apenas a solução de ácido fosfórico 2M, fez com que o BFC II endurecesse rapidamente, oferecendo pouco tempo para manipulação e moldagem, o aditivo utilizado neste trabalho foi pirofosfato de cálcio (CPP) por provocar um retardamento no tempo de pega de BFCs, de acordo com relatos de Bohner *et al* (1996). Aditivos podem ser utilizados para reduzir a quantidade de líquido necessária para a obtenção de uma pasta com viscosidade ideal para sua utilização como cimento. Outro aditivo também utilizado foi o pirofosfato de sódio, adicionado à solução de ácido fosfórico, para também evitar uma reação exotérmica. Para a preparação do BFC II, a fase sólida foi composta por uma mistura contendo 30% de CPP em um almofariz de ágata contendo 60% de β -TCP e 10% de HA. A relação considerada ideal foi de 0,75 mL/g, dentro dos valores testados empiricamente. Portanto, constatou-se que a amostra apresentou um tempo de pega inicial de 3 minutos e tempo final de 7 minutos, próximo à de biocimentos já utilizados comercialmente para aplicações em odontologia (PRATI; GANDOLFI, 2015).

Já o pH, a partir do resultado obtidos da análise, pode-se verificar um valor de pH igual a 7, em função dos aditivos adicionados. Isto é importante pelo fato que materiais com

pH na faixa entre 6,5 a 8 são considerados adequados para implantação (DRIESSENS *et al.*, 1997).

Após o tempo de pega e caracterização do BFC II por difração de raios X para determinar as fases obtidas após hidratação com fase líquida, foi possível observar a formação de 31% de β -TCP, 20% da fase HA e 41% da fase monetita. Estudos comprovam que é possível ocorrer a formação de monetita a partir da reação entre a fase β -TCP e o CPP (GROVER *et al.*, 2005), entretanto, a formação dessa fase após hidratação não afeta na qualidade do biocimento, visto que a monetita é um fosfato de cálcio anidro e o principal componente dos biomateriais sintéticos experimentais avaliados. Esta apresenta uma composição química semelhante ao tecido ósseo e possui grande disponibilidade e alta solubilidade em fluídos fisiológicos. Quando observada *in vivo* é osteocondutora e absorvível (MONTAZEROLGHAEM *et al.*, 2015), além de não apresentar antigenicidade e riscos de transmissão de doenças (KLAMMERT *et al.*, 2009). Esse fosfato permite a formação de um arcabouço estável no local de aplicação, por apresentar biocompatibilidade. Quando implantada, favorece a migração e a adesão de osteoblastos, com resultados similares ao enxerto de osso autógeno (TORRES *et al.*, 2015). Além disso, alguns autores ainda lhe atribuem um potencial osteoindutivo (IDOWU *et al.*, 2014). O produto final após reação de pega de alguns fosfatos de cálcio, como o β -TCP, geralmente é a fase HA, portanto, isso explica o aumento da porcentagem de HA após o tempo final de pega (CHEN *et al.*, 2018).

Mesmo com composição química majoritariamente similar à do BFC I, o BFC II também foi submetido à análise de citotoxicidade, visto que qualquer modificação no processo de síntese ou na sua composição pode causar incompatibilidade (GOLA, 2019). Portanto, para avaliar a citotoxicidade do BFC II, optou-se por realizar o ensaio a partir do extrato do material de acordo com as normas da ISO 10993-5, para evitar as problemáticas já citadas com o contato direto do material e as células. A análise estatística dos resultados demonstrou que as células de osteoblastos não tiveram seu crescimento inibido pelo extrato, pois não houve diferença estatística significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais.

Esse resultado é bastante significativo, visto que células de osteoblastos performam um importante papel no metabolismo de regeneração óssea, pois sua principal função é produzir os constituintes orgânicos da matriz extracelular óssea que facilitam sua mineralização por compostos inorgânicos e fatores parácrinos que juntos promovem a formação de tecido ósseo. A matriz orgânica e inorgânica resultante forma um material composto que resiste tanto ao estresse quanto à deformação e que se adapta às cargas sob as quais é colocado (BRADLEY *et al.*, 2018). Portanto, um enxerto ósseo capaz de proporcionar o ambiente ideal para seu

crescimento é uma forte característica para potenciais materiais a serem aplicados na prática clínica.

Todas essas caracterizações tem como finalidade a implementação dos BFC para auxiliar no tratamento de doenças ósseas, assim como na regeneração óssea guiada em doenças dentárias. Dados da Fundação Internacional de Osteoporose (IOF) apontam que, em 2012, a doença chegou a atingir 10 milhões de brasileiros. Os dados também indicam que uma a cada quatro mulheres, acima de 50 anos, desenvolvem osteoporose. A doença é capaz de aumentar consideravelmente os riscos de fratura, com isso, estudos indicam que o número de fraturas de quadril, no Brasil, seja de 140 mil no ano de 2020 e 160 mil em 2050 (CLARK *et al.*, 2009; KOMATSU; RAMOS; SZEJNFELD, 2004).

Ao utilizar a biotecnologia e outras ciências como ferramentas poderosas no aperfeiçoamento de biomateriais, como os BFC desenvolvidos nesse trabalho, é possível que estes sejam aplicáveis como carreadores de biomoléculas e fármacos que ajudem a melhorar sua performance no tratamento de doenças ósseas como a osteoporose. Alguns exemplos do que se pode ser feito é a utilização de BFC como carregadores da Proteína Morfogénica Óssea (BMPs), as quais são fatores osteoindutores que podem estimular significativamente a nova formação óssea (CHEN *et al.*, 2018) ou a aplicação de BFC como carregadores de anti-inflamatórios capazes de auxiliar no tratamento de doenças ósseas inflamatórias, como a osteomielite. Portanto, o profissional de biotecnologia, que é formado a partir de uma estrutura multidisciplinar, é apto para desenvolver investigações científicas de vários ângulos, sendo assim, capaz de integrar conhecimentos com o objetivo de desenvolver novas metodologias e novas técnicas de análise para o desenvolvimento de biomateriais, tendo um papel fundamental para o desenvolvimento e inovação da ciência dos biomateriais.

Na odontologia, são utilizadas membranas de regeneração óssea guiada para evitar que as células de tecido mole migrem para o local, superpopulem o local do defeito e inibam a infiltração e a atividade das células formadoras de ossos (ELGALI *et al.*, 2017), mesmo após a aplicação de materiais cerâmicos ou osso liofilizado. Com isso, uma hipótese, é que por serem capazes de se moldar à cavidade do defeito e por endurecerem *in situ* após determinado período, os BFC poderiam dispensar o uso da membrana de regeneração óssea guiada, servindo tanto como um material que permita a estrutura necessária para a regeneração óssea, como uma barreira impedindo que a fibrose ocorra.

Portanto, apesar de preliminares, os resultados demonstram que tanto o BFC I, quanto o BFC II são materiais promissores para aplicações biomédicas. Entretanto, outras caracterizações físico-químicas e ensaios biológicos tanto *in vitro* como *in vivo* deverão ser

realizados. Futuramente, algumas análises como resistência a compressão diametral, análise de porosidade, análise por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica entre os BFC e células de osteoblastos, ensaios de ativação de osteoblastos, além de testes de biocompatibilidade tecidual e óssea em animais serão realizadas para comprovar a qualidade e eficácia dos BFC obtidos. Além disso, deseja-se aperfeiçoar as características dos BFC obtidos para que estes possam proporcionar uma melhor performance na regeneração óssea, para isso, técnicas de biotecnologia e farmacologia serão utilizadas tanto para conseguir esse aperfeiçoamento, quanto para estudá-lo.

8 CONCLUSÃO

A partir dos métodos propostos foi possível obter BFC contendo as fases de HA e β -TCP a partir de duas metodologias diferentes. Ambos apresentaram pH próximo a neutro, considerado um pH ideal para aplicações biomédicas.

O tempo de pega inicial e final do BFC I foram ideais para algumas aplicações ortopédicas, já o tempo de pega inicial e final do BFC II foram ideais para aplicações na odontologia e algumas aplicações ortopédicas.

O BFC I não inibiu a viabilidade celular de células de fibroblastos L929 até a concentração de 250 μ g/mL, já o extrato do BFC II não inibiu a viabilidade celular de células de osteoblastos OFCOLL II em nenhum dos grupos experimentais.

Apesar de preliminares, as caracterizações demonstram que tanto o BFC I, quanto o BFC II são materiais promissores para aplicações biomédicas

REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T. et al. **Osseointegration of Implants – A Biological and Clinical Overview**. JSM Dent Surg, 2017.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. **Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration**. European Spine Journal, v. 10, p. S96–S101, 2001.
- ALMOUEMEN, N.; KELLY, H. M.; O’LEARY, C. **Tissue Engineering: Understanding the Role of Biomaterials and Biophysical Forces on Cell Functionality Through Computational and Structural Biotechnology Analytical Methods** Computational and Structural Biotechnology Journal, 2019.
- ALVES CARDOSO, D.; JANSEN, J. A.; G. LEEUWENBURGH, S. C. **Synthesis and application of nanostructured calcium phosphate ceramics for bone regeneration**. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, v. 100B, n. 8, p. 2316–2326, 2012.
- AMARAL, Mauricio Bordini do. **Capacidade de regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária: análise histológica e microtomografia computadorizada**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ASLAN, S. et al. **Antimicrobial biomaterials based on carbon nanotubes dispersed in poly(lactic-co-glycolic acid)**. Nanoscale, 2010.
- ASLANTÜRK, Ö. S. **In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages**. In: Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World. [s.l: s.n.]
- BAHRAMI, M. et al. **Cartilage Tissue Engineering Via Icarin and Adipose-derived Stem Cells in Fibrin Scaffold**. Advanced biomedical research, 2018.
- BARSOUM, M. W. **Fundamentals of ceramics**. [s.l: s.n.].
- BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. **Bone graft materials: An overview of the basic science**. Clinical Orthopaedics and Related Research. Anais...2000^a
- BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. **Bone graft materials: An overview of the basic science**. Clinical Orthopaedics and Related Research, n. 371, p. 10–27, 2000b.
- BENS-NISSAN, B.; PEZZOTTI, G. **Bioceramics: Processing Routes and Mechanical Evaluation**. Journal of the Ceramic of Japan, v. 110, n. 7, p. 601-608, 2002.
- BERTAZZO, S. et al. **Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010.
- BILLOTTE, W.G. **Ceramic Biomaterials - Biomedical Engineering Handbook, Second Edition**, 2000.
- BOSE, S.; TARAFDER, S. **Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and**

- drug delivery for bone tissue engineering: A review.** Acta Biomaterialia, 2012.
- BOSKEY, A. L.; GEHRON, R. P. **The Composition of Bone [Book]. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism**, p. 49–58, 2013.
- BRADLEY, Elizabeth W. et al. **Osteoblasts: Function, Development, and Regulation.** Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, p. 31, 2018.
- BROWN, G. D. et al. **Hydroxyapatite Cement Implant for Regeneration of Periodontal Osseous Defects in Humans.** Journal of Periodontology, 1998.
- CHEN F., MA X., YU Y., LIU C. **Calcium Phosphate Bone Cements: Their Development and Clinical Applications.** In: Developments and Applications of Calcium Phosphate Bone Cements, vol 9, Biomaterials Science and Engineering, pp. 1-39, Springer, 2018.
- CLARK, P. et al. **The prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries: The Latin American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS).** Osteoporosis International, 2009.
- Conselho Federal de Odontologia. **Cresce o número de implantes dentários no Brasil.** Disponível em <<http://cfo.org.br/website/cresce-o-numero-de-implantes-dentarios-no-brasil/>>. Acesso em: 08/09/2019
- CRAVEDI, P. et al. **Regenerative immunology: the immunological reaction to biomaterials.** Transplant International, 2017.
- DESCHASEAUX, F.; SENSÉBÉ, L.; HEYMANN, D. **Mechanisms of bone repair and regeneration.** Trends in Molecular Medicine, v. 15, n. 9, p. 417–429, 2009.
- DIMITRIOU, R. et al. Bone regeneration: Current concepts and future directions BMC Medicine, 2011.
- DORLAND, William Alexander Newman. **Dorland's Illustrated Medical Dictionary32: Dorland's Illustrated Medical Dictionary.** Elsevier Health Sciences, 2011.
- DOROZHKIN, S. V. **Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates.** Acta Biomaterialia, 2012.
- DRIESSENS FCM, FERNÁNDEZ E, GINEBRA MP, BOLTONG MG, PLANELL JA. **Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements.** Anales de Química, Int. Ed. 1997, 93: S38-S43.
- ELGALI, I. et al. **Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited.** European Journal of Oral Sciences, 2017.
- ELIAZ, N.; METOKI, N. **Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications.** Materials, v. 10, n. 4, 2017.
- FERNÁNDEZ, E.; PLANELL, J. A.; BEST, S. M., **Precipitation of carbonated apatite in the**

cement system - α -Ca₃(PO₄)₂-Ca(H₂PO₄)₂-CaCO₃. Journal of Biomedical Materials Research, v. 47, p. 466-471, 1999.

FERRAZ, M. P.; KNOWLES, J. C.; OLSEN, I.; MONTEIRO, F. J. AND SANTOS, J. D., **Flow Cytometry analysis of the effects of pre- immersion on the biocompatibility of glass reinforced hydroxyapatite plasma-sprayed coatings**, Biomaterials, 21, pp. 813- 820, 2000.

GALLINETTI, S.; CANAL, C.; GINEBRA, M. P. **Development and characterization of biphasic hydroxyapatite/ β -TCP cements**. Journal of the American Ceramic Society, 2014.

GERING, C. et al. **Design of modular gellan gum hydrogel functionalized with avidin and biotinylated adhesive ligands for cell culture applications**. PLOS ONE, 2019.

GINEBRA, M. P. et al. **Bioceramics and bone healing**. EFORT Open Reviews, 2018.

GOLA, J. **Quality Control of Biomaterials — Overview of the Relevant Technologies**. Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine, 143–161, 2019.

GROVER, L. M. et al. **Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of β -TCP-pyrophosphoric acid bone cement**. Journal of Materials Chemistry, v. 15, n. 46, p. 4955–4962, 2005.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. Materials Selection. In: Wise, D. L. **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering**, part A v.1. Dekker, Marcel Inc, 1995. p. 27-59.

HING, K. A. **Bioceramic Bone Graft Substitutes : Influence of Porosity and Chemistry**. v. 199, p. 184–199, 2005.

HUEBSCH, N.; MOONEY, D. J. **Inspiration and application in the evolution of biomaterials**. Nature, v. 462, n. 7272, p. 426–432, 2009.

IDOWU, B. et al. **In vitro osteoinductive potential of porous monetite for bone tissue engineering**. Journal of Tissue Engineering, 2014.

International Osteoporosis Foundation. **Latin American Regional Audit - Brazil**. Disponível em: <<https://www.iofbonehealth.org/data-publications/regional-audits/latin-america-regional-audit>>. Acesso em: 21/11/2019.

ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods**. International Organization for standardization, Geneva, 1992.

JACOBS, J. J. **BONE GRAFTS AND THEIR SUBSTITUTES: UNDERSTANDING THE THREE Os**. Orthopaedic Proceedings, v. 99, n. SUPP_7, p. 55, 2017.

JEONG, J. et al. **Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration**. Biomaterials Research, 2019.

KIM, H. S. et al. **Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing**. Advanced Drug Delivery Reviews, 2019.

KLAMMERT, U. et al. **Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing.** Acta Biomaterialia, 2009.

KOMATSU, R. S.; RAMOS, L. R.; SZEJNFELD, V. L. **Incidence of proximal femur fractures in Marilia, Brazil.** Journal of Nutrition, Health and Aging, 2004.

KÖNÖNEN, M.; KIVILAHTI, J. **Concise Review Biomaterials & Bioengineering: Fusing of Dental Ceramics to Titanium.** Journal of Dental Research, 2001.

KWON, S. H. et al. **Synthesis and dissolution behavior of beta-TCP and HA/beta-TCP composite powders.** Journal of the European Ceramic Society, v. 23, n. 7, p. 1039-1045, 2003.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. **Analysis of cell viability by the alamarblue assay.** Cold Spring Harbor Protocols, v. 2018, n. 6, p. 462–464, 2018.

KUMAR, P.; VINITHA, B.; FATHIMA, G. **Bone grafts in dentistry.** Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2013.

Legado Brasil. **Cinco estados recebem mutirão de cirurgia ortopédica.** Disponível em: <<http://legado.brasil.gov.br/noticias/saude/2012/09/cinco-estados-recebem-mutirao-de-cirurgia-ortopedica>>. Acesso em: 09/09/2019

LIU, X. et al. **A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2018.

LURYI, A. L.; BULSARA, K. R.; MICHAELIDES, E. M. **Hydroxyapatite bone cement for suboccipital retrosigmoid cranioplasty: A single institution case series.** American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery, 2017.

MALLICK, K. K.; COX, S. C. **Biomaterial scaffolds for tissue engineering** Frontiers in Bioscience - Elite, 2013.

MONTAZEROLGHAEM, M. et al. **Resorption of monetite calcium phosphate cement by mouse bone marrow derived osteoclasts.** Materials Science and Engineering C, 2015.

OLKOWSKI, R. et al. **Cytocompatibility of the selected calcium phosphate based bone cements: Comparative study in human cell culture.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2015.

OMIDI, M. et al. **Characterization of biomaterials.** In: Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering, 2017.

OSAKA, A. et al. **Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1991.

PRATI, C.; GANDOLFI, M. G. **Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications.** Dental Materials, v. 31, n. 4, p. 351–370, 2015.

RAMPERSAD, S. N. **Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays.** *Sensors* (Switzerland), 2012.

RATNER, B. et al. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.** *Journal of Clinical Engineering*, 1997.

RATNER, B. D. **Biomaterials: Been There, Done That, and Evolving into the Future.** *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2019.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. **Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going.** *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2004a.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. **Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going.** *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 6, n. 1, p. 41–75, 2004b.

RAYNAUD, S. et al. **Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders.** *Biomaterials*, 2002.

REY, C., COMBES, C., DROUET, C., & GROSSIN, D. **Bioactive Ceramics: Physical Chemistry.** [s.l.] Elsevier Ltd., 2011. v. 1

SAMAVEDI, S.; WHITTINGTON, A. R.; GOLDSTEIN, A. S. **Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior.** *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 9, p. 8037–8045, 2013.

SEGAL, D. **Chemical synthesis of ceramic materials.** *Journal of Materials Chemistry*, 1997.

SINGH, A. P. et al. **Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2019.

SUNG, Y. M. et al. **Crystallization and sintering characteristics of chemically precipitated hydroxyapatite nanopowder.** *Journal of Crystal Growth*, 262 (2004) p. 467–472.

STAVROPOULOS, A. et al. **A phase IIa randomized controlled clinical and histological pilot study evaluating rhGDF-5/ β -TCP for periodontal regeneration.** *Journal of Clinical Periodontology*, 2011.

TANG, A. T. H. et al. **Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: Methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device.** *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999.

TANG, Z. et al. **The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics.** *Regenerative Biomaterials*, v. 5, n. 1, p. 43–59, 2018.

THEISS, F. et al. **Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement.** *Biomaterials*, v. 26, n. 21, p. 4383–4394, 2005.

TORRES, J. et al. **Monetite granules versus particulate autologous bone in bone regeneration.** *Annals of Anatomy*, 2015.

VERLAAN, J. J.; ONER, F. C.; DHERT, W. J. A. **Anterior spinal column augmentation with injectable bone cements**. *Biomaterials*, 2006.

VERRET, D. J. et al. **Hydroxyapatite cement in craniofacial reconstruction**. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 2005.

VERRON, E.; BOULER, J. M.; GUICHEUX, J. **Controlling the biological function of calcium phosphate bone substitutes with drugs**. *Acta Biomaterialia*, 2012.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. **Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening**. *Nature Protocols*, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

VO-DINH, T.; CULLUM, B. **Biosensors and biochips: Advances in biological and medical diagnostics**. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000.

WALMSLEY, G. G. et al. **Nanotechnology in bone tissue engineering** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2015.

WANG, W.; YEUNG, K. W. K. **Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review**. *Bioactive Materials*, v. 2, n. 4, p. 224–247, 2017.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials**, 1986.

WILLIAMS, D. F. **On the mechanisms of biocompatibility**. *Biomaterials*, 2008.

WINKLER, T. et al. **A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge**. *Bone and Joint Research*, v. 7, n. 3, p. 232–243, 2018.

YUAN H, LI Y, DE BRUIJN JD, DE GROOT K, Z. X. **Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs**. *Biomaterials*, v. 21, n. 12, p. 1283–1290, 2000.

YUAN, H. et al. **Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 31, p. 13614–13619, 2010.

ZHOU, J. et al. **The controlled release of vancomycin in gelatin/ β -TCP composite scaffolds**. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 100 A, n. 9, p. 2295–2301, 2012.