

ALEXA MAGALHÃES DIAS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VITRO DE
CIMENTO ÓSSEO À BASE DE NANO HIDROXIAPATITAS SUBSTITUÍDAS
COM MAGNÉSIO, ESTRÔNCIO E ZINCO.**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2020**

Alexa Magalhães Dias

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VITRO DE
CIMENTO ÓSSEO À BASE DE NANO HIDROXIAPATITAS SUBSTITUÍDAS
COM MAGNÉSIO, ESTRÔNCIO E ZINCO.**

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Odontologia – área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Esperanza Cortés Segura.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Gomes Speziali.

Belo Horizonte

2020

Ficha Catalográfica

D541d Dias, Alexa Magalhães.
2020 Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro de
T cimento ósseo à base de nano hidroxiapatitas substituídas
com magnésio, estrôncio e zinco / Alexa Magalhães Dias. --
2020.

146 f. : il.

Orientadora: Maria Esperanza Cortés Segura.
Coorientador: Marcelo Gomes Speziali.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Durapatita. 2. Estrôncio. 3. Magnésio. 4. Zinco. I.
Cortés Segura, Maria Esperanza . II. Speziali, Marcelo
Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade
de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

Elaborada por: Miriam Cândida de Jesus - CRB: 6/2727.

Biblioteca Faculdade de Odontologia - FAO UFMG



FOLHA DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VITRO DE CIMENTO ÓSSEO À
BASE DE NANO HIDROXIAPATITAS DOPADAS COM MAGNÉSIO, ESTRÔNCIO E ZINCO

ALEXA MAGALHÃES DIAS

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor, área de concentração Clínica Odontológica.

Aprovada em 24 de julho de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Maria Esperanza Cortes Segura – Orientadora
FO-UFMG

Prof(a). Marcelo Gomes Speziali
UVOP

Prof(a). Anderson Dias
UFMG

Prof(a). Edesia Martins Barros de Sousa
CDTN

Prof(a). Fabiano Vargas Pereira
UFMG

Prof(a). Rogéli Tibúrcio Ribeiro da Cunha Peixoto
FO-UFMG

Defesa Homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia em 31 / 08 / 2020.

Profa. Isabela Almeida Pordeus
Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFMG

Dedico este trabalho, com todo o meu amor e respeito, a DEUS que me suportou nos momentos mais difíceis e me ajudou a seguir em frente quando minha saúde estava debilitada; ao meu pai, que não está mais presente, mas que sempre me incentivou a buscar o conhecimento; a minha mãe que mesmo de longe nunca deixou de me apoiar, aos meus irmãos e sobrinhos que sempre estiveram presentes em minha vida e ao Ramon pelo seu amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda sua proteção e misericórdia, por permitir que eu finalize essa jornada e por me suportar nos momentos de dificuldade e quando minha saúde estava debilitada.

A meu pai, por toda paciência, amor, exemplo e ensinamentos. Você sonhou em ter um filho graduado em química e isso não aconteceu. Mas eu gosto de pensar que um pouquinho do seu sonho se realizou comigo nesse doutorado, porque eu precisei fazer uma imersão no complexo e instigante universo da química.

A minha mãe por toda dedicação e amor que teve comigo durante toda a minha trajetória estudantil, me incentivando a não perder as oportunidades e me ajudando dentro da nossa realidade.

Aos meus irmãos Poliana, Myrtes e Francisco pelo amor, carinho e torcida constantes. Obrigada por me apoiarem durante toda a minha vida.

Aos meus sobrinhos Yuri, Igor, Criza, Narely e Ana Clara pelo amor, carinho e convivência.

Ao meu amor, Ramon por todo companheirismo, carinho, paciência e amizade. Sou muito grata pelo nosso encontro!

A minha orientadora Dra. Maria Esperanza Cortés Segura, pelo comprometimento, apoio, carinho e paciência comigo durante esses anos de convivência. Minha gratidão por todos os ensinamentos, conselhos e momentos vividos.

Ao meu coorientador professor Dr. Marcelo Gomes Speziali agradeço por toda ajuda, paciência e contribuições dadas durante esses anos de doutorado.

Ao professor Dr. Rubén Dário Sinisterra pelo acolhimento e ensinamentos durante o percurso. Agradeço pela oportunidade de aprender e executar esse trabalho no laboratório e por você deixar as portas do LEMB abertas para mim.

A todos os colegas do LEMB pela ajuda, paciência, ensinamentos e convivência. Gratidão especial a Ana Délia, Ana Paula, Isabela e Flávia que me ajudaram imensamente.

Ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia e a UFMG pela formação e oportunidade de ter cursado o doutorado em uma Instituição de Ensino Superior de excelência.

A todos os professores da Pós-Graduação em Odontologia pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

Ao Departamento de química e infraestrutura por permitir a execução das minhas análises. E aos funcionários, colegas e porteiros da química por toda ajuda e convivência.

A UFJF por primar pelo desenvolvimento e capacitação de servidores e por conceder meu afastamento para cursar o Doutorado.

A PROGEPE/UFJF e ao Programa PROQUALI pelo apoio e incentivo à qualificação.

Ao Departamento de Odontologia UFJF-GV por apoiar meu afastamento e contribuir para minha qualificação.

A todos os meus amigos, familiares e as pessoas não mencionadas aqui, mas que me ajudaram a realizar esse sonho. Agradeço por entenderem a minha ausência e por terem suportado meu estresse, em muitos momentos. Minha eterna gratidão!

“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais retornará ao tamanho
original”.

Albert Einstein

RESUMO

A incorporação de íons na estrutura da hidroxiapatita (HA) pode afetar sua estrutura, cristalinidade, solubilidade e citotoxicidade. Dentre os íons presentes na composição da apatita óssea, o magnésio (Mg^{2+}), estrôncio (Sr^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) são reconhecidos por promover a angiogênese e osteogênese. Portanto, as HAs substituídas podem apresentar melhor bioatividade, por fornecer íons com potencial de estimular a neoformação óssea nos locais enxertados. Nesse contexto, este estudo descreve a síntese, caracterização e comparação de uma série de nano-hidroxiapatitas (nHAs) substituídas e co-substituídas por Sr^{2+} , Mg^{2+} ou Zn^{2+} . Em seguida, foi desenvolvido um cimento ósseo à base das HAs com melhores resultados de citotoxicidade, associado ao DCPA, gelatina e quitosana. As nHAs foram caracterizadas físico-quimicamente usando diferentes técnicas. O método de co-precipitação foi eficaz para sintetizar HAs de dimensões nanométricas. Comparado a nHA pura, os difratogramas, espectros de FTIR e parâmetros de rede das nHAs substituídas e co-substituídas exibiram alterações, indicando que a incorporação de cátions resultou em distorções da rede da HA. Os testes de MTT demonstraram que as nHAs sintetizadas não foram citotóxicas, após contato direto com culturas de fibroblastos (L929) e pré-osteoblastos (MC3T3). Os resultados obtidos sugerem que as nHAs co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} e Zn^{2+}/Sr^{2+} parecem induzir maior proliferação de células fibroblásticas e osteoblásticas, quando comparado a HA pura e substituída. Os cimentos ósseos desenvolvidos apresentaram capacidade de auto-endurecimento e resistência à lavagem. Além de possuírem alta molhabilidade e um perfil de liberação de íons Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} , que está dentro das doses indicadas para estimular a proliferação de osteoblastos. Os cimentos exibiram excelente biocompatibilidade *in vitro* em culturas de células fibroblásticas, endoteliais e osteoblásticas. Os cimentos contendo nHAs co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} exibiram os melhores resultados de viabilidade celular. Após 24 horas de contato indireto com cultura de células fibroblásticas L929, o crescimento celular do grupo C2 foi maior que de todos os grupos em estudo ($P < 0,01$). Em cultura de células endoteliais EA.hy926, o percentual de células viáveis do grupo C3 foi significativamente maior que de todos os outros grupos, após 24 horas ($p < 0,001$). A citotoxicidade indireta em cultura de células pré-osteoblásticas MC3T3 revelou que após 48 horas, o grupo C3 apresentou maior viabilidade celular que todos os grupos em estudo ($p < 0,01$). O teste de formação de tubo sugere que todos os cimentos desenvolvidos possuem potencial angiogênico, sendo que os cimentos contendo nHAs co-substituídas por Zn^{2+}/Sr^{2+} exibiram resultados significativamente superiores ($p < 0,001$). Apesar de ser necessário um maior número de testes de biocompatibilidade; a incorporação de íons na rede cristalina das nHAs, que são reconhecidos por afetar a angiogênese e a osteogênese, parece ter resultado no desenvolvimento de cimentos ósseos com potencial para promover a regeneração óssea.

Palavras-chaves: Hidroxiapatita substituída. Hidroxiapatita co-substituída. Estrôncio. Magnésio. Zinco. Cimento ósseo.

ABSTRACT

Development, characterization and in vitro evaluation of bone cement based on nano-hydroxyapatites substituted with magnesium, strontium and zinc.

The incorporation of ions into the HA lattice can affect its structure, crystallinity, solubility and cytotoxicity. From the ions present in the composition of bone apatite, Mg^{2+} , Sr^{2+} and Zn^{2+} are recognized for promoting angiogenesis and osteogenesis. The substituted HAs can be present better bioactivity for supplying ions with potential to stimulate bone neoformation in grafted sites. This study described the synthesis, characterization and comparison of a range of substituted and co-substituted nHAs contained Sr^{2+} , Mg^{2+} or Zn^{2+} . Then, it developed bone cement based on HAs with better cytotoxicity results, associated with DCPA, gelatin and chitosan. The nHAs were physicochemically characterized using different techniques. The co-precipitation method was effective for synthesizing HAs with nanometric dimensions. Compared to pure nHA, the diffractograms, FTIR spectra and lattice parameters of the substituted and co-substituted nHAs showed changes, indicating that the incorporation of cations resulted in distortions of the HA lattice. MTT tests demonstrated that the all synthesized nHAs were not cytotoxic after direct contact with fibroblasts (L929) and pre-osteoblasts (MC3T3) cultures. MTT results suggest that Mg^{2+}/Sr^{2+} and Zn^{2+}/Sr^{2+} co-substituted nHAs seem to induce more proliferation of fibroblastic and osteoblastic than pure and Mg^{2+} , Sr^{2+} and Zn^{2+} substituted nHAs. Bone cements developed showed self-hardening and washout resistance. Also, they Exhibited high wettability and ion release profile with non-toxic concentrations of Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} , range within indicated doses to stimulate the proliferation of osteoblasts. The cement exhibited excellent in vitro cytocompatibility in fibroblastic, endothelial and osteoblastic cell cultures. Cement containing Mg^{2+}/Sr^{2+} co-substituted nHAs showed better results of the cell viability. After 24 hours of indirect contact with L929 fibroblast culture, the cell growth in the C2 group was highest than all study groups ($P < 0.01$). In EA.hy926 endothelial culture, the cell viability of the C3 group was significantly highest than all other groups after 24 hours ($p < 0.001$). The indirect cytotoxicity in MC3T3 pre-osteoblastic culture revealed that after 48 hours, the C3 group showed the greatest cell viability than all the study groups ($p < 0.01$). The tube formation assay suggests that all cement have angiogenic potential, being that the cements containing Zn^{2+} / Sr^{2+} co-substituted nHAs exhibited significantly better results ($p < 0,001$). Despite being necessary to perform a more significant number of biocompatibility tests, the incorporation of ions into the nHA lattice, which are recognized for affects angiogenesis and osteogenesis, may have resulted in the development of bone cements with the potential to promoting bone regeneration.

Keywords: Substituted hydroxyapatite. Co-substituted hydroxyapatite. Strontium. Magnesium. Zinc. Bone cement.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da célula unitária do cristal da HA e sítios de íons de cálcio encontrados na rede cristalina da HA. A: Sítio do Ca (I) site: possui 4 Ca (I) dispostos em colunas. B: Sítio do Ca (II): há 6 locais de Ca (II), situados em posições triangulares, ao longo do eixo c.	27
Figura 2. Representação esquemática de possíveis substituições na rede cristalina da HA. A: Substituição catiônica. B: Substituição aniônica.	30
Figura 3. Esquema do processo de síntese da HA pelo método de co-precipitação.	46
Figura 4. Micrografias de MET das nHAs sintetizadas: (A) HA-P, (B) HA-Mg5%, (C) HA-Mg10%r5%, (D) HA-r5%, (E) HA-Sr10%, (F) HA-Zn5%, (G) HA-Zn10%, (H) HA-SrMg2,5%, I) HA-SrMg5%, J) HA-SrZn2,5%, K) HA-SrZn5%.	63
Figura 5. Histogramas de distribuição do comprimento das partículas de nHA: (A) HA-P, (B) HA-Mg5%, (C) HA-Mg10%, (D) HA-Sr5%, (E) HA-Sr10%, (F) HA-Zn5%, (G) HA-Zn10%, (H) HA-SrMg2,5%, I) HA-SrMg5%, J) HA-SrZn2,5%, K) HA-SrZn5%.	65
Figura 6. Histogramas de distribuição da largura das partículas de nHA: (A) HA-P, (B) HA-Mg5%, (C) HA-Mg10%, (D) HA-Sr5%, (E) HA-Sr10%, (F) HA-Zn5%, (G) HA-Zn10%, (H) HA-SrMg2,5%, I) HA-SrMg5%, J) HA-SrZn2,5%, K) HA-SrZn5%.	66
Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das nHAs, magnificações de 1000x. A: HA-P; B: HA-Mg5%; C: HA-Mg10%; D: HA-Sr5%; E: HA-Sr10%; F: HA-Zn5%; G: HA-Zn10%; H: HA-MgSr2,5%; I: HA-MgSr5%; J: HA-ZnSr2,5%; K: HA-ZnSr5%.	67
Figura 8. Espectro EDS das nHAs pura e substituídas. A: HA-P; B: HA-Mg5%; C: HA-Mg10%; D: HA-Sr5%; E: HA-Sr10%; F: HA-Zn5%; G: HA-Zn10%.	68
Figura 9. Espectro EDS das nHAs co-substituídas. A: HA-SrMg2,5%; B: HA-SrMg5%; C: HA-SrZn2,5%; D: HA-SrZn5%.	69
Figura 10. Difractogramas de Raios-x das Hidroxiapatitas pura e substituídas com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+}	73

Figura 11. Difratomogramas de Raios-x das Hidroxiapatitas pura e co-substituídas com $\text{Sr}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ou $\text{Sr}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$.	74
Figura 12. Difratomogramas de Raios-x detalhados, em 2θ entre 20° e 40° , das nHAs pura e substituídas com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} .	75
Figura 13. Difratomogramas de Raios-X detalhados das amostras de HA-P, HA-Mg10%, HA-Sr10% e HA-Zn10% evidenciando o deslocamento dos picos de difração que foram observados nos difratogramas das nHAs substituídas.	76
Figura 14. Difratomogramas de Raio x detalhados, em 2θ entre 20° e 40° , das Hidroxiapatitas pura e co-substituídas com $\text{Sr}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ou $\text{Sr}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$.	79
Figura 15. Espectros FITR das nHAs pura e substituídas com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} .	81
Figura 16. Espectros FITR das nHAs pura e co-substituídas com $\text{Mg}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$.	82
Figura 17. Espectros FITR detalhados, em 1800-430, das nHAs pura e substituídas com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} .	83
Figura 18. Espectros FTIR detalhados, em 1800-430, das nHAs pura e co-substituídas com $\text{Mg}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$.	84
Figura 19. Curvas TG das Hidroxiapatitas pura e substituídas com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} .	86
Figura 20. Curvas TG das Hidroxiapatitas pura e duplamente substituídas com $\text{Mg}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$.	87
Figura 21. Isotermas de adsorção-dessorção das HAs pura e substituídas por Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} .	89
Figura 22. Isotermas de adsorção-dessorção das HAs pura e co-substituídas por $\text{Mg}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$.	90
Figura 23. Citotoxicidade dos grupos de nHA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em contato direto com fibroblastos L929, após 24, 48 e 72 horas.	93
Figura 24. Citotoxicidade dos grupos de nHA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em contato direto com as células pré-osteoblásticas MC3T3, após 24, 48 e 72 horas.	94
Figura 25. Citotoxicidade dos grupos de nHA (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em contato direto com as células pré-osteoblásticas MC3T3, após 24, 48 e 72 horas.	95
Figura 26. Difratomogramas de raios-x dos Cimentos à base de HA e picos de difração correspondentes a hidroxiapatita, fosfato de cálcio bibásico anidro e quitosana.	98

Figura 27. Difractogramas de raios-x dos principais componentes dos cimentos ósseos: hidroxiapatita pura (HA-P), fosfato de cálcio bibásico anidro (DCPA), quitosana e gelatina.	99
Figura 28. Espectros FI-TR dos cimentos à base de HA.	101
Figura 29. Espectros FI-TR dos principais componentes dos cimentos ósseos: hidroxiapatita pura (HA-P), fosfato de cálcio bibásico anidro (DCPA), quitosana e gelatina.....	102
Figura 30. Curvas TG dos cimentos desenvolvidos: C1, C2, C3, C4 e C5. ...	103
Figura 31. Variação do pH dos cimentos, imersos em FCA, após 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos da presa dos cimentos.....	107
Figura 32. Variação do pH dos cimentos, imersos em FCA, após 1 a 4 dias da presa dos cimentos.	108
Figura 33. A: Avaliação visual dos cimentos ósseos após o teste de resistência a lavagem. B: Porcentagem de resistência à lavagem dos cimentos C1, C2, C3, C4 e C5.	110
Figura 34. Imagens da medida do ângulo de contato da água sobre a superfície dos cimentos, após 1 segundo de experimento.	111
Figura 35. Concentração de cálcio na água deionizada, após a imersão dos cimentos ósseos por 28 dias.....	114
Figura 36. Concentração de estrôncio na água deionizada, após a imersão dos cimentos ósseos por 28 dias.....	115
Figura 37. Concentração de magnésio na água deionizada, após a imersão dos cimentos ósseos por 28 dias.....	116
Figura 38. Concentração de zinco presente em água deionizada, após a imersão dos cimentos ósseos por 28 dias.....	117
Figura 39. Ensaio de redução do MTT, após contato indireto dos cimentos ósseos com fibroblastos L929, após 24, 48 e 72 horas.	118
Figura 40. Ensaio de redução do MTT, após contato indireto dos cimentos ósseos com as células endoteliais EA.hy926, após 24, 48 e 72 horas.	119
Figura 41. Ensaio de redução do MTT, após contato indireto dos cimentos ósseos com as células pré-osteoblásticas MC3T3, após 24, 48 e 72 horas..	120
Figura 42. Teste de proliferação das células pré-osteoblásticas MC3T3 semeadas sobre os cimentos ósseos, após 1 e 4 dias.	121

Figura 43. Imagens de microscopia óptica do teste de formação de tubos, em cultura de células EA.hy926, dos grupos de cimento e controle nos tempos 0 (imagens à esquerda) e após 24h de experimento (imagens à direita)..... 124

Figura 44. Distribuição do número de tubos formados pelas células endoteliais EA.hy926 em contato com extratos dos cimentos desenvolvidos. 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição e características de alguns dos principais fosfatos de cálcio.	25
Tabela 2. Grupos de HAs sintetizadas pelo método de co-precipitação.	47
Tabela 3. Grupos dos cimentos ósseos desenvolvidos.	53
Tabela 4. Resumo da relação Ca /P e das relações (Ca + M) / P das nHAs sintetizadas, calculado a partir da quantificação fornecida por EDS.	70
Tabela 5. Incorporação teórica e experimental em mol (%) dos íons Mg, Sr e Zn na rede cristalina das nHAs substituídas e co-substituídas.	71
Tabela 6. Parâmetros da rede das amostras de nHA, incluindo os parâmetros de rede a, c, volume da célula unitária (V), tamanho médio do cristalito (D) e grau de cristalinidade (Xc).	78
Tabela 7. Percentuais de perda de massa total das nHAs em 600 °C.	86
Tabela 8. Valores de área superficial específica, diâmetro do poro, potencial zeta (em pH 7), comprimento de partícula e forma das partículas de nHAs. ...	92
Tabela 9. Percentuais de perda de massa, dos cimentos ósseos, ocorrido durante o aquecimento entre 25-600°C.	104
Tabela 10. Tempos de presa inicial e final dos cimentos ósseos desenvolvidos.	106
Tabela 11. Medidas de ângulo de contato nos cimentos após 1 e 30 s de experimento.	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFCs - Cimentos Fosfato de Cálcio

DCPA - Fosfato de Cálcio Bibásico Anidro

DCPD - Fosfato de Cálcio Bibásico Dihidratado

DMEM - Meio de Cultura Dulbecco's Modificado Eagle Medium

FC - Fosfato de Cálcio

FCA - Fluido Corporal Artificial

FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

HA - Hidroxiapatita

HADC - Hidroxiapatita Deficiente em Cálcio

HAs - Hidroxiapatitas

ICDD - Centro Internacional de Dados de Difração

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

Mg - Magnésio

MTT - Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio

P - Fosforo

PBS - Solução Tampão de Fosfato

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

Sr - Estrôncio

TCP - Fosfato Tricálcico

Zn - Zinco

α -TCP - α -Fosfato Tricálcico

β -TCP - β -Fosfato Tricálcico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	JUSTIFICATIVA	23
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1	Biocerâmicas de fosfato de cálcio.....	24
3.1.1	Hidroxiapatita.....	26
3.1.2	Hidroxiapatita substituída com metais	29
3.1.3	Hidroxiapatita com substituição Catiônica por Estrôncio, Magnésio e Zinco	31
3.1.3.1	Estrôncio (Sr).....	31
3.1.3.2	Magnésio (Mg)	33
3.1.3.3	Zinco (Zn).....	34
3.2	Fosfato de cálcio bibásico anidro (DCPA)	35
3.3	Cimentos Fosfato de Cálcio (CFCs)	37
3.4	Cimento ósseo composto por cristais de HA e polímeros naturais	39
4	OBJETIVOS	43
4.1	Objetivo geral	43
4.2	Objetivos específicos	43
5	METODOLOGIA.....	44

5.1	Considerações éticas	44
5.2	Reagentes utilizados.....	44
5.3	Síntese de Hidroxiapatita pura e com Diferentes Dopagens.....	45
5.4	Caracterização físico-química das partículas de Hidroxiapatita... 47	
5.4.1	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	47
5.4.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	48
5.4.3	Espectroscopia de absorção atômica	48
5.4.4	Difração de Raios-X de pó	49
5.4.5	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	50
5.4.6	Análise térmica	51
5.4.7	Espalhamento de luz eletroforético	51
5.4.8	Determinação da área superficial específica e distribuição do poro	51
5.5	Propriedades dos cimentos ósseos	52
5.5.1	Composição	52
5.5.2	Caracterização físico-química dos cimentos ósseos.....	53
5.5.3	Teste de presa.....	53
5.5.4	Teste de pH	54
5.5.5	Teste de resistência à lavagem	54
5.5.6	Molhabilidade.....	55
5.5.7	Concentração de íons	56
5.6	Testes biológicos <i>in vitro</i>	56
5.6.1	Preparação das amostras de Hidroxiapatita	56
5.6.2	Preparação das amostras de Cimento Ósseo	57
5.6.3	Cultura de células.....	57
5.6.4	Citotoxicidade direta	57
5.6.5	Citotoxicidade indireta	59

5.6.6	Teste de Proliferação	59
5.6.7	Teste de formação de tubo	60
5.7	Análise estatística	61
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
6.1	Caracterização físico-química das hidroxiapatitas	62
6.1.1	Morfologia e distribuição de tamanho das hidroxiapatitas.....	62
6.1.2	Morfologia da superfície e análise elementar das nHAs	66
6.1.3	Difração de Raios-X de pó	72
6.1.4	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	80
6.1.5	Análise térmica	85
6.1.6	Potencial Zeta	87
6.1.7	Determinação da área de superfície e tamanho de poro	89
6.2	Teste de citotoxicidade das nano-hidroxiapatitas	92
6.3	Caracterização físico-química dos cimentos ósseos	97
6.3.1	Difração de raios-X.....	97
6.3.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	99
6.3.3	Análise térmica	103
6.3.4	Teste de presa.....	104
6.3.5	Teste de pH	107
6.3.6	Teste de resistência à lavagem	109
6.3.7	Molhabilidade.....	110
6.3.8	Imersão em água deionizada e mudanças na concentração de íons	112
6.4	Testes biológicos <i>in vitro</i> dos Cimentos	117
6.4.1	Citotoxicidade dos Cimentos Ósseos	117

6.4.2	Teste de Proliferação	121
6.4.3	Teste de formação de tubo	123
7	CONCLUSÕES	127
	REFERÊNCIAS.....	129

1 INTRODUÇÃO

Na última década, os biomateriais utilizados na reconstrução dos tecidos ósseos foram significativamente melhorados (CZECHOWSKA *et al.*, 2016) e apesar do auto-enxerto ser considerado o padrão-ouro para enxertia óssea (GROBARDT *et al.*, 2010), a síntese de substitutos ósseos alternativos continua a ser um dos principais alvos de interesse da pesquisa tecnológica (LANDI *et al.*, 2006).

A hidroxiapatita (HA) é o principal constituinte mineral do osso natural e representa 65% do seu peso. A apatita biológica é deficiente em cálcio e composta por cristais nanométricos, de baixa cristalinidade e alta solubilidade. Além disso, contém quantidades traços de íons incorporados na rede cristalina ou adsorvidos a sua superfície, incluindo substituições aniônicas (F^- , Cl^- , SiO_4^{4-} e CO_3^{2-}) e / ou catiônicas (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+}) (CACCIOTTI *et al.*, 2009). Por outro lado, a HA estequiométrica contém cálcio e fósforo na proporção molar de 1,67, possui alta cristalinidade e baixa solubilidade, podendo ser inadequada para o reparo ósseo (AZIZEH-MITRA *et al.*, 2014; CHADHA *et al.*, 2020). Assim, muitos estudos têm se dedicado ao desenvolvimento de hidroxiapatitas (HAs) sintéticas substituídas por íons, que possuem menor cristalinidade e maior solubilidade, apresentando melhor degradação e bioatividade que a HA pura (RATNAYAKE, MUCALO e DIAS, 2016).

De fato, a incorporação de íons na estrutura da HA pode afetar sua cristalinidade, carga superficial, solubilidade e outras propriedades vitais, que resultam em modificações no desempenho biológico (SUPOVÁ, 2015). Além de disponibilizar esses íons para o meio, à medida que os cristais de HA forem sendo reabsorvidos. Dentre os íons presentes na composição da apatita óssea, o magnésio (Mg^{2+}), o estrôncio (Sr^{2+}) e o zinco (Zn^{2+}) são reconhecidos por inibir a atividade dos osteoclastos e promover a proliferação de osteoblastos (BOANINI, GAZZANO e BIBI, 2010; OKADA e MATSUMOTO, 2015). Por outro lado, as HAs de dimensões nanométrica podem exibir melhor resistência

mecânica e aumento da adsorção de proteínas e adesão celular (AZIZEH-MITRA *et al.*, 2014).

Na busca de obter HAs sintéticas com estrutura mais próxima da HA presente no tecido ósseo, muitos trabalhos sintetizaram HAs substituídas por um (AINA *et al.*, 2013; BEGAM *et al.*, 2017; COX *et al.*, 2014) ou mais íons (KULANTHAIVEL *et al.*, 2015; LOWRY *et al.*, 2017). Nesse sentido, também é importante escolher métodos de síntese apropriados para obtenção de HAs. A precipitação aquosa tem sido reconhecida como um bom método, por possuir baixo custo, simplicidade de execução e facilidade de aplicação na produção industrial (LATOCHA *et al.*, 2018). Portanto, vários estudos utilizaram esse método para sintetizar HAs em baixa temperatura (IAFISCO *et al.*, 2014; GUERRA-LÓPES *et al.*, 2015; FRASNELLI *et al.*, 2017; PREDOI *et al.*, 2019).

No entanto, a dificuldade em manter os grânulos de HA no local do defeito ósseo levou à necessidade da criação de compósitos e cimentos ósseos (GUTIERRES *et al.*, 2006). Os cimentos de fosfato de cálcio (CFCs) foram desenvolvidos com a finalidade de fornecer uma pasta de fosfato de cálcio (FC) com capacidade de auto endurecimento e que fosse moldável ao defeito ósseo (BIGI, BRACCI e PANZAVOLTA, 2004; GINEBRA *et al.*, 2012).

Os CFCs são formados pela combinação de fosfatos de cálcio (FC) a uma solução líquida. Em geral, os produtos finais obtidos após a reação de presa destes cimentos são a HA ou a brushita (BIGI, BRACCI e PANZAVOLTA, 2004; GINEBRA *et al.*, 2012). Esses cimentos apresentam desvantagens como a baixa resistência à compressão e a lavagem (ARYAEI *et al.*, 2015; UNUMA e MATSUSHIMA, 2013). Além disso, podem apresentar taxas de reabsorção incompatíveis com as necessidades clínicas, uma vez que a brushita é muito solúvel, podendo ser reabsorvida antes de ocorrer a neoformação óssea. Por outro lado, como a HA tem baixa solubilidade sua taxa de reabsorção é muito lenta dificultando a substituição do enxerto pelo osso do hospedeiro (EVIS e WEBSTER, 2011; GUTIERRES *et al.*, 2006; HAIDER *et al.*, 2017).

No intuito de obter cimentos ósseos com melhores propriedades mecânicas e de reabsorção, alguns trabalhos desenvolveram cimentos compostos por HAs nanoparticuladas (LI *et al.*, 2009), substituídas (CZECHOWSKA *et al.*, 2016; SLÓSARCZYK *et al.*, 2010; ZIMA *et al.*, 2012) ou com superfície

modificada (KONISHI *et al.*, 2017; QI *et al.*, 2013). Por outro lado, o fosfato de cálcio bibásico anidro (DCPA) é utilizado na composição de vários CFCs e tem sido considerado como uma alternativa promissora para regeneração óssea, por possuir excelentes propriedades de bioatividade e osteocondutividade (IDOWU *et al.*, 2014).

No entanto, os implantes ósseos devem fornecer um ambiente mais próximo possível do natural. Como o tecido ósseo é formado por uma matriz orgânica (principalmente colágeno) e uma fase mineral (apatita); muitos biomateriais têm combinado FC com polímeros naturais, com a finalidade de fabricar materiais compósitos com resistência mecânica, elasticidade e tenacidade semelhante a do osso (HAIDER *et al.*, 2017). Assim, alguns cimentos ósseos combinaram partículas de HA com polímeros naturais, como a quitosana e a gelatina (BIGI, BRACCI e PANZAVOLTA, 2004; CZECHOWSKA *et al.*, 2016; KONISHI *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2009).

Nesse contexto, o desenvolvimento de um cimento ósseo que tenha em sua composição o DCPA e HAs substituídas com um ou mais íons como o Sr^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} , que reconhecidamente exercem funções no processo de regeneração óssea, pode resultar na obtenção de um biomaterial com capacidade osteoindutiva. Somado a isso, a incorporação de quitosana e gelatina na composição do cimento pode melhorar suas propriedades de resistência à lavagem e a compressão, além de fornecer vantagens adicionais para promoção da osteogênese e angiogênese.

Assim, um dos objetivos deste trabalho foi sintetizar uma série de nano hidroxiapatitas (nHAs) substituídas e co-substituídas por Sr^{2+} , Mg^{2+} e/ou Zn^{2+} , pelo método de precipitação aquosa, em baixa temperatura e nas mesmas condições experimentais. Para avaliar e comparar a influência da substituição e co-substituição nas propriedades físico-químicas e na citotoxicidade das nHAs. Concluída essa etapa, este trabalho se dedicou ao desenvolvimento, caracterização e teste *in vitro* de um cimento ósseo à base das nHAs que exibiram os melhores resultados de citotoxicidade. Com a finalidade de obter melhores propriedades mecânicas e biológicas foi adicionado à composição dos cimentos, o DCPA, a gelatina e a quitosana.

2 JUSTIFICATIVA

Estima-se que 2,3% da população global, cerca de 158 milhões de pessoas em todo o mundo, seja desdentada. Nesses indivíduos, a perda dentária resulta na reabsorção dos ossos alveolares e gera mudanças morfológicas que dificultam ou impedem a reabilitação com implantes dentários.

Uma variedade de tratamentos tem sido empregada para permitir a instalação de implantes, dentre os quais, os procedimentos de enxertia com osso autógeno são considerados o padrão ouro. No entanto, a remoção de tecido ósseo de áreas doadoras intra-orais, da calota craniana ou da crista ilíaca gera expressiva morbidade trans e pós-operatória e aumento dos custos do tratamento.

Assim, o desenvolvimento de substitutos ósseos com comportamento e desempenho biológico semelhante ao auto-enxerto é muito importante para eliminar a necessidade de múltiplos procedimentos cirúrgicos e também para fornecer aos pacientes tratamentos menos invasivos e com menor morbidade cirúrgica e pós-operatória. Além disso, a produção de tecnologias nacionais é fundamental para diminuir os custos dos tratamentos odontológicos e ampliar o acesso destes, a população.

Nesse contexto, a síntese de HAs substituídas e co-substituídas por íons surgiu como uma proposta para preparar um biomaterial para enxertia, por mimetizar propriedades da apatita óssea. Portanto, é importante compreender as modificações estruturais, o comportamento biológico e a bioatividade deste material. Por outro lado, a dificuldade em manter os grânulos de HA no local do defeito ósseo gera a necessidade de desenvolver cimentos com características de osteocondutividade. Assim, o desenvolvimento de um cimento ósseo à base de nHAs co-substituídas associadas à biopolímeros naturais e que possua capacidade de auto endurecimento *in situ* e de manutenção no local do defeito ósseo é desejável.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biocerâmicas de fosfato de cálcio

Os ortofosfatos de cálcio são sais provenientes do ácido fosfórico (H_3PO_4), que formam compostos contendo íons: $(\text{H}_2\text{PO}_4)^-$, $(\text{HPO}_4)^{2-}$ e $(\text{PO}_4)^{3-}$. Dentre estes, os íons $(\text{H}_2\text{PO}_4)^-$ se formam apenas em condições muito ácidas e não são encontrados em sistemas biológicos. No entanto, os íons $(\text{HPO}_4)^{2-}$ e $(\text{PO}_4)^{3-}$ ocorrem na fase mineral dos ossos e dentes e em várias calcificações patológicas (ELLIOTT, 1994).

De fato, existem 11 ortofosfatos de cálcio com relação molar Ca/P que variam entre 0,5 e 2,0 (DOROZHKIN, 2009). Dentre estes, os FC do grupo apatita são amplamente difundidos na natureza, constituem os principais componentes inorgânicos do tecidos duros e possuem na sua composição básica o cálcio (Ca^{2+}), o fosfato (PO_4^{3-}) e o íon hidroxila (OH^-) (DOROZHKIN, 2009; EVIS e WEBSTER, 2011).

Os FC sintéticos têm gerado muito interesse na pesquisa biomédica, pois se parecem à matriz inorgânica do osso e possuem excelentes propriedades de biocompatibilidade. Além disso, como são sintetizados em laboratório podem ser obtidos em grandes quantidades para serem usados em procedimentos de enxertia, evitando a necessidade de procedimentos cirúrgicos em sítios doadores. A tabela 1 resume as características de alguns dos principais FC encontrados na natureza.

Os biomateriais de FC são reabsorvíveis, ou seja, com o tempo são solubilizados e substituídos por tecido natural. No entanto, esses compostos apresentam diferentes taxas de degradação e bioatividade, que variam de acordo com a cristalinidade, pureza de fase e relação Ca/P dos mesmos. São relativamente insolúveis em pH 7,4 e solúveis em ambientes ácidos com pH abaixo de 6,5 (BOSE *et al.*, 2013; BOSE e TARAFDER, 2012; MAITRA, 2005). Como exemplo, o Fosfato Tricálcico (TCP) é um material que possui alta taxa de reabsorção no corpo, baixa cristalinidade e propriedades mecânicas muito

pobres. Por outro lado, a HA sintética apresenta alta cristalinidade e lenta taxa de dissolução (EVIS e WEBSTER, 2011).

Tabela 1. Composição e características de alguns dos principais fosfatos de cálcio.

Mineral	Fórmula química	Relação Ca/P	Características
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	É o mineral mais estável e insolúvel dos FC. Possui estrutura química semelhante ao componente mineral de ossos e dentes.
Fosfato Octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	É mais solúvel que a HA e menos solúvel que os outros FC.
β- Fosfato Tricálcico (β-TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	Possui solubilidade intermediária entre os FC e alta taxa de reabsorção.
α- Fosfato Tricálcico (α-TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	Metaestável à temperatura ambiente, sofre hidrólise mais facilmente que o β -TCP. Rápida reabsorção.
Fosfato de cálcio bibásico anidro (DCPA)	CaHPO_4	1.0	Hidrolisa com facilidade para fases mais estáveis, OCP e HA.
Fosfato Tetracálcico (TTPA)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$	2.0	Possui pH fortemente básico. Reage com a água produzindo HA e hidróxido de cálcio.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Nesse contexto, as cerâmicas de FC têm sido utilizadas como biomateriais para regeneração óssea por possuírem propriedades de

osteocondução e por facilitarem a migração, fixação e proliferação células ósseas. No entanto, esses compostos não são osteoindutores, ou seja, não são capazes de estimular a osteogênese. Somado a isso, possuem baixa resistência mecânica a compressão, o que limita seu uso como material de suporte para o crescimento ósseo (BOSE *et al.*, 2013; GUTIERRES *et al.*, 2006).

3.1.1 Hidroxiapatita

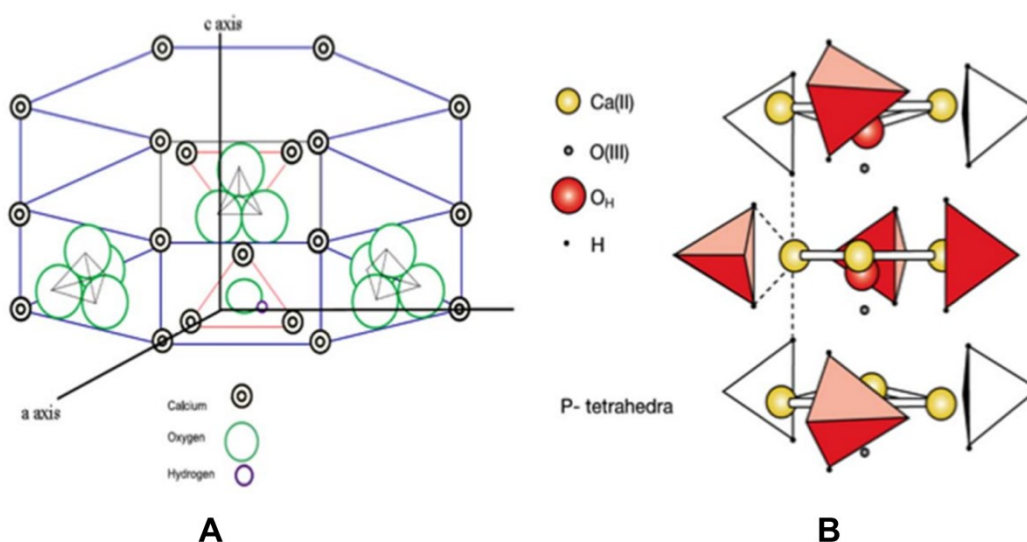
A HA pertence à família das cerâmicas de FC, cuja fórmula geral é $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ e fórmula de célula unitária $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A HA estequiométrica contém 39,68% em massa de cálcio e 18% em massa de fósforo dando origem a uma razão molar Ca/P de 1,67 (RAMESH, MORATTI e DIAS, 2017; RATNAYAKE, MUCALO e DIAS, 2016).

A HA pode ser encontrada na forma de estrutura cristalina monoclinica ou hexagonal. A forma monoclinica é facilmente desestabilizada pela presença de impurezas e muda para fase hexagonal em temperaturas acima de 250 °C, por essa razão a forma hexagonal geralmente está presente em apatitas biológicas (DOROZNIKIN, 2011). A célula unitária hexagonal possui 10 íons Ca localizados em dois sítios diferentes: M (I) e M (II). No sítio I, há quatro íons Ca (I) alinhados em colunas. Cada íon Ca (I) está cercado por seis átomos de oxigênio de diferentes tetraedros do grupo PO_4 e menos fortemente a três outros átomos de oxigênio mais distantes. No sítio II, há seis íons cálcio dispostos nos ápices de triângulos equiláteros perpendiculares ao eixo c da estrutura cristalina. Cada íon Ca (II) está cercado por seis átomos de oxigênio dos grupos PO_4 e um átomo de oxigênio do grupo OH. Assim, os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo c da estrutura. Além disso, colunas constituídas pelo empilhamento dos triângulos equiláteros dos íons cálcio e oxigênio, estão ligadas entre si pelos íons fosfatos, proporcionando estabilidade à estrutura. Os átomos de oxigênio dos grupos hidroxila estão situados acima ou abaixo do eixo formado pelos

triângulos de cálcio e a ligação O-H forma um ângulo de aproximadamente 30° com o eixo c (HAIDER et al., 2017; RATNAYAKE; MUCALO; DIAS, 2016). A representação esquemática da célula unitária da HA está representada na Figura 1.

A estrutura cristalina hexagonal da HA possui dois eixos cristalinos: a e c. O eixo a é rico em íons Ca, portanto é carregado positivamente; por outro lado o eixo c é rico em grupos fosfato e hidroxila, apresentando carga negativa. Assim, a superfície das HAs exibem características anisotrópicas, com diferentes perfis de adsorção de moléculas e íons (ELLIOTT, 1994; KAWASAKI, 1991; OKADA e MATSUMOTO, 2015).

Figura 1. Representação esquemática da célula unitária do cristal da HA e sítios de íons de cálcio encontrados na rede cristalina da HA. A: Sítio do Ca (I) site: possui 4 Ca (I) dispostos em colunas. B: Sítio do Ca (II): há 6 locais de Ca (II), situados em posições triangulares, ao longo do eixo c.



Fonte: RATNAYAKE; MUCALO; DIAS, 2016, p.6.

A HA sintética é semelhante à fase mineral dos ossos e dentes, porém existem diferenças químicas e estruturais entre a HA estequiométrica e a biológica. A apatita biológica não é estequiométrica, tem baixa cristalinidade e é formada por cristais nanométricos. Essas apatitas são carbonatadas e contêm espécies químicas em quantidade traço, como: CO_3^{2-} , Na^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} ,

F⁻, Zn²⁺ e silicato. Esses íons podem estar incorporados na rede cristalina da HA ou adsorvidos em sua superfície. Assim, as fases minerais do osso, esmalte e dentina exibem diferenças de composição iônica, cristalinidade e solubilidade. Essas características determinam a alta solubilidade das HAs biológicas quando comparado a HA estequiométrica (RATNAYAKE, MUCALO e DIAS, 2016).

De fato, a HA estequiométrica é a forma mais estável, densa e insolúvel dos sais de FC, podendo se manter estável a temperatura ambiente e pH entre 4 a 14. Portanto, a HA sintética é altamente insolúvel e reabsorve muito lentamente *in vivo*, podendo se manter no organismo durante anos. A reabsorção é um processo mediado por células e influenciado não apenas pela solubilidade do material, mas também por uma série de parâmetros, como a química, morfologia, cristalinidade e área superficial dos cristais de HA (APARICIO e GINEBRA, 2015; BOSE *et al.*, 2013; DOROZNKIN, 2011).

No entanto, devido a sua similaridade com a composição mineral do osso, a HA têm sido amplamente utilizada como material de enxertia (APARICIO e GINEBRA, 2015; EVIS e WEBSTER, 2011). Apresenta como vantagens ser um material bioativo, não tóxico e osteocondutor, capaz de formar ligações químicas diretas com o osso e tecidos vivos. Porém, a HA sintética é mais frágil que a HA biológica, o que inviabiliza seu uso em estado puro, como suporte de carga funcional (EVIS e WEBSTER, 2011; KALITA e BHATT, 2007; RATNAYAKE, MUCALO e DIAS, 2016).

Idealmente os materiais de enxertia devem ser capazes de preencher o defeito ósseo e também de promover a regeneração óssea. Nesse sentido, há uma grande dificuldade de obter sincronia entre a reabsorção do material implantado e a remodelação óssea. Por exemplo, os biomateriais a base de TCP, podem muitas vezes ser reabsorvidos antes da osteogênese. Por outro lado, apesar da biocompatibilidade e estrutura favorável à invasão vascular, a HA possui uma taxa de reabsorção muito lenta dificultando a substituição do enxerto por osso nativo (EVIS e WEBSTER, 2011; GUTIERRES *et al.*, 2006; HAIDER *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, muitos esforços têm sido direcionados na melhoria das propriedades mecânicas e biológicas da HA sintética. Nesse sentido, como os

minerais naturais do osso são de escala nanométrica, têm se buscado aperfeiçoar a síntese de HAs nanocristalinas (EVIS e WEBSTER, 2011). No geral, são considerados nanopartículas, àquelas de tamanho de igual ou inferior a 100 nanômetros (OKADA e MATSUMOTO, 2015). Acredita-se que devido ao aumento da área de superfície, a HA nanocristalina apresenta melhor densidade e sinterização, o que melhora suas propriedades mecânicas. Além disso, as nanohidroxiapatitas são associadas à melhora da função de osteoblastos e conseqüentemente da osseointegração (EBRAHIMI, BOTELHO e DOROZHKIN, 2017; EVIS e WEBSTER, 2011). Portanto, o uso clínico da HA nanoparticulada tem sido mais desejável (BOSE e SAHA, 2003; EVIS e WEBSTER, 2011).

No intuito de produzir biomateriais com composição mineral mais próxima ao tecido ósseo natural, outra estratégia muito utilizada é a incorporação de íons na estrutura da HA sintética. De fato, substituições iônicas na rede da HA produzem efeitos significativos sobre seus parâmetros de rede, estrutura cristalina, morfologia, solubilidade e estabilidade térmica (RATNAYAKE, MUCALO e DIAS, 2016).

3.1.2 Hidroxiapatita substituída com metais

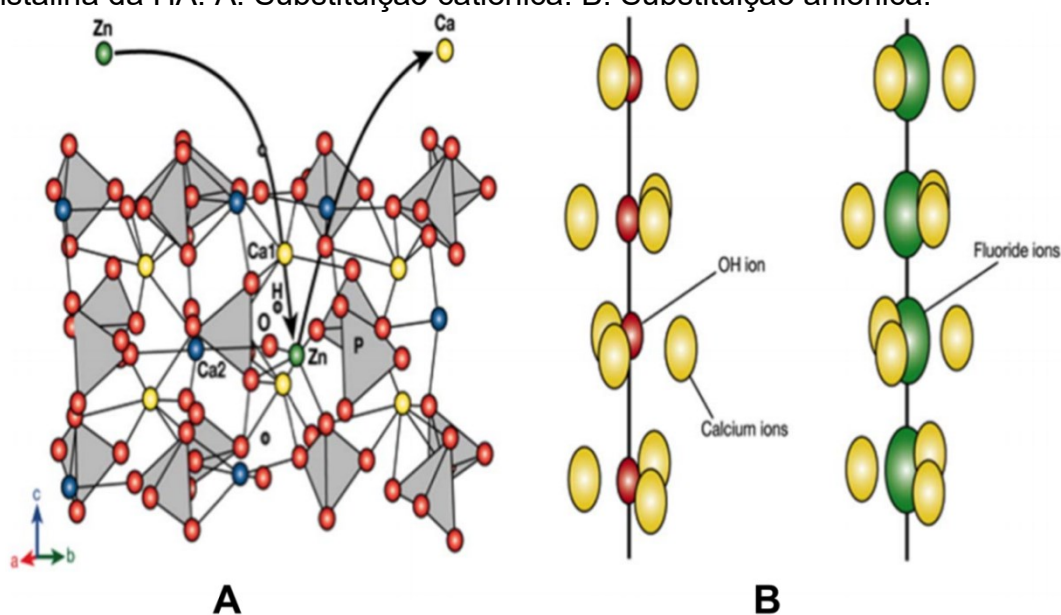
Modificações na estrutura da HA sintética são feitas, com a finalidade de obter cristais de composição química mais próxima ao mineral ósseo. Dentre as possibilidades, as substituições iônicas causam modificações nos parâmetros de rede e na cristalinidade da HA, ao mesmo tempo em que mantém sua estrutura hexagonal (SUPOVÁ, 2015).

A substituição iônica ocorre quando um ou mais íons substituem elementos que constituem a HA, sendo que tanto o cálcio, como os grupos fosfato e hidroxila podem ser substituídos (EVIS e WEBSTER, 2011). As substituições catiônicas ocorrem quando cátions substituem o cálcio e as substituições aniônicas ocorrem quando os grupos PO_4^{-3} ou OH^- são substituídos por íons. Por exemplo, um grupo carbonato aniônico pode

substituir parcialmente o grupo OH^- (sítio A) ou o grupo PO_4^{3-} (sítio B). O grupo hidroxila também pode ser substituído por halogênios, particularmente o flúor (SHEPERD, SHEPERD e BEST, 2012; SUPOVÁ, 2015).

Em geral, os cátions de raio atômico menor que o Ca^{2+} substituem o Ca (I), porque o alinhamento em colunas e a curta distância entre os átomos, torna esse sítio mais adequado para cátions menores ou para pequenas quantidades de cátions maiores que o Ca. Por outro lado, as distâncias entre os átomos de Ca (II) são relativamente grandes e os átomos estão dispostos em camadas consecutivas, portanto o sítio II geralmente acomoda cátions maiores que o Ca^{2+} (APARICIO e GINEBRA, 2015). As propriedades físico-químicas das HAS substituídas podem variar de acordo com o raio iônico do dopante, sítio substituído (Ca^{2+} , PO_4^{3-} ou OH^-) e percentual molar de substituição (APARICIO e GINEBRA, 2015; BOSE *et al.*, 2013). Além disso, a rede cristalina da HA pode receber substituições por um único (AL-WAFI *et al.*, 2017; BEGAM *et al.*, 2017) ou múltiplos dopantes (GEN *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2016). Uma representação esquemática da incorporação de íons na célula cristalina da HA pode ser vista na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática de possíveis substituições na rede cristalina da HA. A: Substituição catiônica. B: Substituição aniônica.



Fonte: RATNAYAKE, MUCALO e DIAS, 2016, p.7.

De fato, a substituição iônica ou incorporação de íons na estrutura da HA pode resultar em alteração das suas propriedades físico-químicas, modificando: a estrutura, cristalinidade, tamanho de partícula, estabilidade térmica, carga superficial, resistência mecânica, solubilidade e taxa de degradação. Essas mudanças podem resultar no melhor desempenho biológico das HAs (BOSE *et al.*, 2013; EVIS e WEBSTER, 2011; SUPOVÁ, 2015).

Assim, os diferentes tipos de substituições na rede da HA podem dar origem a vários tipos de apatitas, que exibem diferentes graus de osteocondutividade, bioatividade e taxas de reabsorção (SHEPERD, SHEPERD e BEST, 2012). Nesse contexto, a substituição catiônica tem sido objeto de grande interesse devido ao desempenho de alguns íons na atividade biológica do osso. Muitos íons metálicos podem ter efeitos benéficos para osteogênese. Há evidências de que os íons Zn^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} desempenham um papel vital na osteogênese e/ ou angiogênese (BOSE *et al.*, 2013).

Somado a isso, vários íons mostraram ser capazes de induzir a diferenciação de precursores de osteoblastos através de vias de sinalização de fatores de crescimento (O'NEILL *et al.*, 2018). Além disso, as HAs substituídas têm significativas vantagens em termos de biodegradabilidade e bioatividade em comparação com a HA estequiométrica. Assim a combinação de múltiplas dopagens (ou co-substituições) da HA, pode ser importante para explorar as ações de diferentes íons na regeneração óssea conduzida por biomateriais (BOSE *et al.*, 2013; O'NEILL *et al.*, 2018).

3.1.3 Hidroxiapatita com substituição Catiônica por Estrôncio, Magnésio e Zinco

3.1.3.1 Estrôncio (Sr)

O Sr é um elemento traço presente no mineral ósseo, que representa 0,035% do conteúdo de cálcio do sistema esquelético (BOSE *et al.*, 2013).

Possui um raio iônico (0,12 nm) maior que o Ca^{2+} (0,099 nm), por isso a substituição da HA com Sr gera uma expansão de parâmetros a e c da rede cristalina e como consequência ocorre um aumento de volume da célula unitária da HA. No entanto, o efeito do Sr^{2+} na cristalinidade e morfologia da HA varia com a porcentagem de incorporação: o baixo teor de Sr^{2+} induz uma redução de tamanho e alteração da forma dos cristais; por outro lado, a cristalinidade e as dimensões médias dos cristais, aumentam em níveis relativamente altos de Sr (BIGI *et al.*, 2007; BOANNI, GAZZANO e BIGI, 2010; O'DONNELL *et al.*, 2008).

A incorporação do Sr na estrutura da HA, pode ocorrer com a ocupação do sítio de Ca(I) ou Ca(II). A literatura é conflitante sobre a preferência específica do local de substituição, porém descobertas recentes concluíram que a incorporação do Sr ocorre predominantemente no sítio M (II), embora em baixas concentrações ocorra preferencialmente no sítio M (I) (BIGI *et al.*, 2007; TERRA *et al.*, 2009).

A substituição do Ca pelo Sr^{2+} sempre afeta a solubilidade da HA. Quanto maior o teor de Sr, maior será a solubilidade da HA. Assim, o percentual de substituição afeta a liberação iônica (de Ca^{2+} e Sr^{2+}) e a resposta biológica da HA substituída (APARICIO e GINEBRA, 2015).

De fato, o Sr pode influenciar a resposta celular, mesmo quando incorporado na estrutura da HA. Alguns estudos sugerem que a influência do Sr no comportamento das células ósseas é dose-dependente (CAPUCCINI *et al.*, 2009; BOANINI *et al.*, 2010).

O Sr parece estimular a formação óssea por um mecanismo de ação dupla: promove a proliferação e diferenciação de osteoblastos e ao mesmo tempo, inibe a células osteoclásticas diminuindo a reabsorção óssea (SAIDAK e MARIE, 2012). Há relatos de que o Sr promove a diferenciação osteogênica de células mesenquimais; além de atuar na expressão da proteína óssea morfogenética- 2 induzindo o aumento da atividade da enzima fosfatase alcalina e da mineralização da matriz óssea (YANG *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2013). Assim, o Sr incorporado em biomateriais de FC pode afetar a angiogênese por estimular a proliferação de células endoteliais e a formação de tubos (CHEN *et al.*, 2008).

Assim, devido ao papel estimulador do Sr na formação óssea, o desenvolvimento de biomateriais com HAs substituídas com Sr pode aumentar a eficiência dos substitutos ósseos.

3.1.3.2 Magnésio (Mg)

O Mg é o quarto elemento mais abundante no corpo humano, sendo que 50% do Mg corporal está armazenado no tecido ósseo (APARICIO e GINEBRA, 2015). Possui raio iônico (0,069 nm) consideravelmente menor que o Ca^{2+} (0,099 nm); porém a substituição parcial de Mg^{2+} por Ca^{2+} ocorre de forma satisfatória havendo indícios de que ocupa preferencialmente o sítio de Ca (II). As diferenças de raio iônico entre os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} resultam em distorção da rede, redução das dimensões do eixo c e conseqüente diminuição da cristalinidade da HA (BIGI *et al.*, 1992; SUPOVÁ, 2015). O grau de cristalinidade da HA substituída diminui com o aumento do teor de Mg e, conseqüentemente a HA substituída apresenta maior solubilidade que a HA estequiométrica (BOANNI, GAZZANO e BIGI, 2010; LANDI *et al.*, 2008).

O Mg desempenha um papel fundamental no metabolismo ósseo, pois influencia a atividade osteoblástica e osteoclástica, e conseqüentemente o crescimento ósseo. De fato, estimula a proliferação de osteoblastos durante os estágios iniciais da osteogênese e está presente em grande quantidade na apatita óssea no início da remodelação óssea (BIGI *et al.*, 1992; BOANNI, GAZZANO e BIGI, 2010; RATNAYAKE, MUCALO e DIAS, 2016).

Há relatos de estudos, *in vitro* e *in vivo*, de que a substituição de FC com Mg melhora a proliferação e adesão de células osteoblásticas, além de promover o aumento de produção da enzima fosfatase alcalina (LANDI *et al.*, 2008; XUE *et al.*, 2008). Somado a isso, altas doses de Mg foram relacionadas a manutenção da função vascular *in vitro*, sendo que o Mg parece estimular a produção de óxido nítrico nas células endoteliais exercendo um papel semelhante ao do fator de crescimento endotelial vascular (BOSE *et al.*, 2013).

Assim, a incorporação de Mg em biomateriais pode melhorar as propriedades osteoindutivas e a remodelação óssea promovida pelos materiais de enxertia, uma vez que a presença do Mg pode aumentar a diferenciação e proliferação de osteoblastos, bem como a mineralização da matriz óssea (O'NEILL *et al.*, 2018).

3.1.3.3 Zinco (Zn)

O Zn é um elemento traço presente em uma pequena fração do mineral ósseo, mas é considerado essencial para o metabolismo ósseo (CRUZ *et al.*, 2018). A substituição da HA por Zn diminui os parâmetros de rede da estrutura cristalina, pois o raio iônico do Zn^{2+} (0,075 nm) é menor que o do Ca^{2+} (0,099 nm). O Zn^{2+} substitui preferencialmente o sítio Ca (II) e promove alterações da morfologia e cristalinidade da HA (SUPOVÁ, 2015). Além disso, as relações Ca/P e $(Ca + Zn) / P$ diminuem com o aumento do teor de Zn e a estequiometria não é mais mantida. Assim, o Zn apresenta um papel inibitório da síntese de HA reduzindo o tamanho dos cristais e diminuindo sua estabilidade térmica (ANWAR *et al.*, 2016; BEGAM *et al.*, 2017; BOANNI, GAZZANO e BIGI, 2010).

A incorporação do Zn também resulta no aumento da solubilidade da HA e em maior disponibilidade de Zn para o meio. Essa característica pode ser muito importante para o desenvolvimento de novos substitutos ósseos, uma vez que o Zn tem um papel estabelecido no metabolismo ósseo. O Zn pode suprimir a diferenciação de osteoclastos e aumentar a apoptose dessas células, contribuindo para inibir a reabsorção óssea. Por outro lado, também estimula a osteogênese por induzir a proliferação de osteoblastos e estimular a atividade da enzima fosfatase alcalina e a mineralização da matriz óssea (BOSE *et al.*, 2013; YAMAGUCHI e WEITZMANN, 2011; O'NEILL *et al.*, 2018).

O Zn também atua como um agente antibacteriano através da produção de espécies reativas de oxigênio (LEMIRE, HARRISON e TURNER, 2013). Suas propriedades antibacterianas foram relatadas em vários biomateriais para

aplicações ósseas, incluindo a hidroxiapatita (O'NEILL *et al.*, 2018). Também, há relatos de que materiais de FC substituídos com Zn estimularam a proliferação *in vitro* de osteoblastos e a neoformação óssea *in vivo* (BEGAM *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2009).

Nesse contexto, uma recente revisão sistemática concluiu que a incorporação de Zn em FC demonstra ser biocompatível e tem potencial para aumentar o reparo ósseo. No entanto, apesar do Zn exercer um papel de estimular o metabolismo ósseo, o uso clínico de biomateriais contendo esse íon ainda depende de muitos fatores, especialmente em relação a segurança associada a esse elemento (CRUZ *et al.*, 2018).

3.2 Fosfato de cálcio bibásico anidro (DCPA)

O DCPA (CaHPO_4) é uma das fases precursoras da formação de HA. Em humanos é encontrado na forma de cálculos urinários e dentais, podendo estar presente também em calos ósseos formados durante a cicatrização de fraturas (ELLIOTT, 2013; Dorozhkin, 2014). Além disso, o DCPA existe na natureza como o mineral monetita, descrito pela primeira vez em 1882, por estar presente em rochas formadas por depósitos de fosfato da ilha de Moneta (arquipélago de Porto Rico) (SHEPARD, 1882).

A forma di-hidratada da monetita (CaHPO_4) é a brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; fosfato de cálcio bibásico dihidrato) e apesar da semelhança química, esses compostos podem se comportar de formas muito diferentes. A cristalização do DCPA pode ocorrer por vários métodos, dentre eles a desidratação da cerâmica brushita. O DCPA pode ser obtido a partir de soluções aquosas que contenham: relação Ca / P em torno de 1, pH entre 2,0 e 6,5 e temperaturas acima de 90°C. Além disso, a monetita pode ser preparada na temperatura ambiente em sistemas não aquosos ou restritos em água (DOROZHKIN, 2014).

O DCPA e o fosfato de cálcio bibásico dihidrato (DCPD) possuem alta reatividade química e podem ser empregados como intermediários na preparação da HA (MULONGO-MASAMBA *et al.*, 2017). De fato, esses

compostos têm sido utilizados como componentes de cimentos ósseos baseados em FC. Algumas dessas formulações consistem na mistura de TTCP e fosfato de cálcio (DCPA ou DCPD) com uma solução aquosa. Quando esses FC são expostos a solução aquosa, eles se dissolvem liberando íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , que reagem formando HA deficiente em cálcio (HADC) (DOROZHKIN, 2013).

Assim, dentre os diferentes fosfatos de cálcio, o DCPA e o DCPD têm sido utilizados para enxertia óssea devido à sua metaestabilidade em condições fisiológicas. A HA é a forma mais estável dos FC e por isso apresenta lenta reabsorção. Por outro lado, a brushita é rapidamente reabsorvida in vivo e quando entra em contato com os fluidos orgânicos, tende a se dissolver e recristalizar em HA. Essa transformação ocorre por dissolução ácida, podendo afetar negativamente a viabilidade celular (GAMA et al., 2014). No entanto, devido à ausência de inclusões de água, o DCPA é menos solúvel do que DCPD e quando implantado in vivo não se transforma na fase HA, o que mantém sua composição química e permite sua substituição por tecido ósseo recém-formado (TAMIMI et al., 2010; IDOWU et al., 2014).

Nesse contexto, a monetita é uma alternativa promissora para regeneração óssea. De fato, suas propriedades de bioatividade e osteocondutividade foram reconhecidas (IDOWU et al., 2014; Tamimi, Sheikh e Barralet, 2012). Também foi demonstrado que a reabsorção in vivo do DCPA é muito mais rápida que a da HA (Tamimi et al., 2008). Além disso, a aplicação de grânulos de monetita em defeitos cranianos na calvária de coelhos estimulou a regeneração óssea (TAMIMI et al., 2008). Adicionalmente, grânulos de monetita foram implantados, em alvéolos após a extração dentária, resultando em maior percentual de regeneração óssea que a HA bovina (TAMIMI et al., 2010). Assim, o uso de grânulos de monetita tem surgido como uma nova terapia para regeneração de defeitos ósseos em pacientes submetidos a cirurgias orais e maxilofaciais (Sheikh et al., 2020).

3.3 Cimentos Fosfato de Cálcio (CFCs)

Os CFCs foram desenvolvidos há mais de duas décadas e representaram um grande avanço no campo da biocerâmica. A possibilidade de ter uma pasta de FC moldável ao local do enxerto trouxe benefícios para várias situações clínicas, como o tratamento de fraturas instáveis, de defeitos e deformidades maxilofaciais e na vertebroplastia (BIGI, BRACCI e PANZAVOLTA, 2004; GINEBRA *et al.*, 2012).

Em geral, os CFCs são formados por uma combinação de um ou mais ortofosfatos de cálcio, que são misturados a uma solução líquida. A reação de presa do cimento é um processo de dissolução e precipitação, e o entrelaçamento dos cristais precipitados é o mecanismo responsável pelo endurecimento dos CFCs (GINEBRA *et al.*, 2012). Quando os constituintes dos CFCs são misturados ao líquido começa a ocorrer uma solubilização dos sais de FC. Na medida em que esses sais são solubilizados, eles se precipitam em cristais e formam um emaranhado de cristais de FC, que dão rigidez mecânica ao cimento (BOHNER, GBURECK e BARRALET, 2005; UNUMA e MATSUSHIMA, 2013).

Teoricamente, o produto da reação de presa pode ser qualquer um dos ortofosfatos de cálcio que se precipitam em baixa temperatura e em sistemas aquosos. No entanto, apesar de existirem várias formulações de CFCs com diferentes misturas de ortofosfatos de cálcio; os produtos finais obtidos após a reação de presa do cimento são: a apatita (HA precipitada ou HADC) ou brushita. A grande diferença entre a formação de apatita ou brushita é o pH em que a reação ocorre: pH neutro ou básico dá origem a apatita e pH ácido (inferior a 6) forma a brushita (BIGI, BRACCI e PANZAVOLTA, 2004; GINEBRA *et al.*, 2012).

Geralmente, os cimentos de apatita contêm na sua constituição pós de TCP e/ou Fosfato tetracálcico ou ainda, DCPA ou DCPD (TAS e ALDINGER, 2005; UNUMA e MATSUSHIMA, 2013). Por outro lado, muitos cimentos brushita utilizam o ácido fosfórico (H_3PO_4) para reagir com o TCP (DOROZHKIN, 2011).

Uma das características mais importantes dos cimentos de apatita é que a ligação entre os cristais de HA (recém-formados) é fraca. Assim, estes cristais podem facilmente se separar da massa do cimento. Para melhorar essas propriedades são utilizados aditivos ácidos que retardam a reação de presa e promovem uma dissolução homogênea dos sais de FC. Um dos aditivos mais utilizados é o hidrogeno fosfato de sódio (Na_2HPO_4). Esse recurso é importante porque aumenta a quantidade de cristais precipitados e evita que ocorra apenas a dissolução parcial dos sais de FC. (DOROZHKIN, 2011; GINEBRA *et al.*, 2012).

Somado a isso, têm-se adicionado na composição do CFCs materiais solúveis como, o NaHCO_3 e Na_2HPO_4 , que durante a reação de endurecimento promovem a criação de porosidades na massa do cimento. A macroporosidade tem o papel de guiar e apoiar o crescimento celular dentro do material de enxertia, permitindo que as etapas de proliferação celular e angiogênese possam ocorrer ao longo da reabsorção progressiva do biomaterial (GINEBRA *et al.*, 2012).

Os CFCs podem ser desenvolvidos na forma de pastas injetáveis ou sistemas de pastas moldáveis, sendo destinados para aplicações de regeneração óssea, pois conduzem o crescimento de células osteoblásticas sobre sua superfície. Porém, esses cimentos apresentam desvantagens como migração do enxerto, baixa resistência mecânica, fratura por fadiga e baixa resistência à lavagem (ARYAEI *et al.*, 2015; UNUMA e MATSUSHIMA, 2013).

Essas propriedades precisam ser melhoradas para aplicações clínicas, assim muitas técnicas têm sido empregadas para melhorar as propriedades mecânicas do CFCs. Com esse intuito tem crescido o uso de nanopartículas no processo de fabricação dos CFCs. Além disso, como a resistência a lavagem é fundamental para evitar que o CFC se desintegre precocemente em contato com sangue ou outros fluidos (CHIANG *et al.*, 2010), a adição de polímeros como a quitosana, têm sido empregada para melhorar essa propriedade (ARYAEI *et al.*, 2015).

3.4 Cimento ósseo composto por cristais de HA e polímeros naturais

Os CFCs disponíveis no mercado possuem propriedades de degradação insatisfatórias. Os CFCs de natureza apatita apresentam baixa taxa de reabsorção, sendo estáveis demais para permitir a degradação do material e a substituição por osso neoformado. Em contrapartida, os CFCs brushita geralmente possuem elevada solubilidade, assim o processo de degradação deste cimento ocorre mais rapidamente que a neoformação óssea (CZECHOWSKA *et al.*, 2016; EVIS e WEBSTER, 2011; GINEBRA *et al.*, 2010; ZIMA *et al.*, 2012).

Assim, implantes ósseos com degradação muito lenta ou muito rápida não possuem os requisitos clínicos ideais, pois o material de enxertia deve ser degradado, reabsorvido, e progressivamente substituído por tecido neoformado (CZECHOWSKA *et al.*, 2016).

Na busca de substitutos ósseos com melhores propriedades de reabsorção, foram desenvolvidos cimentos compostos pela associação de sulfato de cálcio hemi-hidratado com HA substituída com titânio (SLÓSARCZYK *et al.*, 2010) ou HA co-substituída por Mg^{2+} e CO_3^{2-} (ZIMA *et al.*, 2012), sendo propostos como materiais de fácil moldagem e alto potencial para regeneração óssea.

No entanto, as propriedades mecânicas dos cimentos ósseos também precisam ser melhoradas. Há relatos, de que a incorporação de polímeros como a quitosana e a gelatina na composição dos CFCs, pode resultar no aumento significativo das propriedades mecânicas e da resistência à lavagem (ARYAEI *et al.*, 2015; BIGI, BRACCI e PANZAVOLTA, 2004).

A quitosana é um polissacarídeo hidrofílico natural, derivado da desacetilação da quitina, que é o principal componente de conchas de crustáceos e exoesqueletos de artrópodes (CHENITE *et al.*, 2000). Possui propriedades de biocompatibilidade, atividade antibacteriana e antifúngica (EWEIS, ELKHOLY e ELSABEE, 2006; SHEPHERD, READER e FALSHAW, 1997; SHI *et al.*, 2006). Há indícios de que a quitosana tem capacidade de favorecer neoformação óssea e a angiogênese (WANG *et al.*, 2002).

A gelatina é obtida por desnaturação térmica ou degradação física e química do colágeno. É um polímero biocompatível, reabsorvível e derivado de fontes ricas em colágeno Tipo I. O colágeno usado para a fabricação de gelatina pode ser derivado de diferentes fontes, sendo a bovina e a porcina, as mais utilizadas (GORGIEVA e KOLOL, 2011). O uso da gelatina pode trazer benefícios adicionais do ponto de vista biológico, devido a sua semelhança com a matriz extracelular óssea e também pela presença da sequência ácida arginina-glicina-aspártico, que aumenta a adesão de células osteoblásticas (BIGI, BRACCI e PANZAVOLTA, 2004; MONTUFAR *et al.*, 2010).

Considerando as características biológicas dos polímeros citados e o fato do tecido ósseo ser formado por uma matriz orgânica (principalmente colágeno tipo I) e uma fase mineral (apatita); o desenvolvimento de compostos híbridos contendo biopolímeros e FC pode ser muito vantajoso por se assemelhar à morfologia e propriedades do osso natural (CHIANG *et al.*, 2010; HAIDER *et al.*, 2017).

Assim, alguns autores desenvolveram cimentos ósseos, que combinam partículas de HA com polímeros naturais. Li *et al.* (2009) desenvolveram um cimento de nHA e quitosana, contendo óxido de zinco. Os estudos *in vivo* demonstraram que após quatro semanas, os cimentos implantados em defeitos ósseos na tíbia de coelhos se ligou ao osso circundante e induziu nova formação óssea. Além disso, Qi *et al.* (2013) desenvolveram um cimento ósseo injetável composto por sulfato de cálcio e HADC ligada a um copolímero multi (aminoácido). O cimento apresentou boa biocompatibilidade em culturas de células MC3T3 e capacidade de induzir osteogênese quando implantado em defeitos no fêmur de coelhos.

Similarmente, Czechowska *et al.* (2016) desenvolveram um cimento ósseo composto por nHA substituída com titânio, quitosana e sulfato de cálcio. Os autores verificaram que a nHA substituída com titânio promoveu melhora da bioatividade do cimento, e que a quitosana promoveu coesão e a criação de uma camada orgânica homogênea na superfície do material. Foi sugerido que a taxa de reabsorção de materiais à base de sulfato de cálcio pode ser otimizada pela adição de quitosana e nHA substituída com titânio. Também, Konishi *et al.* (2017) relataram que um cimento injetável, composto por

partículas de HA (com superfície modificada por fosfato de inositol) e uma solução de quitosana, apresentou boa biocompatibilidade em culturas de células osteoblásticas e osteocondutividade *in vivo* usando um modelo de tibia de porco.

No entanto, a incorporação de polímeros naturais, como a quitosana e gelatina, pode prolongar o tempo de endurecimento dos cimentos ósseos (CHIANG *et al.*, 2010; CZECHOWSKA *et al.*, 2016). Como as características de presa dos cimentos influenciam sua aplicabilidade clínica, o desenvolvimento de novas formulações deve considerar a incorporação de aditivos que diminuam o tempo de presa.

Nesse sentido, como descrito anteriormente, os CFCs são compostos de uma solução aquosa e de pós de um ou vários FC. A mistura do pó seco com a solução aquosa resulta na dissolução dos FC e na consequente formação e precipitação de cristais de HA. Esses cristais se depositam formando um emaranhado de microplacas de HAs, que fornecem rigidez mecânica e o endurecimento dos cimentos (DOROZHKIN, 2013). No entanto, o tempo de dissolução dos FC varia de acordo com sua composição química e com o pH da solução. Assim, os cimentos compostos basicamente por partículas de HA, tendem a apresentar maior tempo de endurecimento devido à relativa estabilidade e baixa solubilidade das partículas de HA. Nesse contexto, apesar do DCPA possuir boa estabilidade em pH fisiológico é mais solúvel que a HA. Portanto, além de oferecer excelentes propriedades de biocompatibilidade, o DCPA pode ser adicionado à fase em pó dos cimentos à base de HA na busca de diminuir o tempo de endurecimento dos mesmos.

De fato, se um cristalito de DCPA (CaHPO_4) for colocado na água, ele se dissolve fornecendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} na proporção molar de 1: 1 (Ishikawa, 2010). A interação entre esses íons resulta numa solução saturada em HA. Porém, a solução permanece insaturada em relação ao CaHPO_4 e este continua a se dissolver. Como consequência, ocorre a supersaturação crítica de HA, que resulta na precipitação de cristais de HADC e na diminuição da relação Ca/P da solução para menos de um. Os processos de dissolução do CaHPO_4 e precipitação da HA continuam, até que uma solução saturada em CaHPO_4 seja alcançada, cessando sua dissolução. Os núcleos de HADC se

formam e se depositam nos locais onde o grau de supersaturação é mais alto, ou seja, nas superfícies do CaHPO_4 . Portanto, à medida que a hidrólise prossegue o CaHPO_4 fique coberto de HA (BROWN, 1999). Assim, o DCPA pode contribuir para redução dos tempos de presa por fornecer os sítios de nucleação necessários para iniciar a formação de HA (ISHIKAWA e EANES, 1993).

Somado a isso, o endurecimento dos cimentos ósseos compostos por uma mistura de HA e DCPA pode ser auxiliado por um segundo mecanismo. A mistura de CaHPO_4 e HA na temperatura ambiente, pode gerar uma reação ácido-base envolvendo FC e água, resultando na formação e precipitação de HADC (BROWN, 1992).

Nesse cenário, o desenvolvimento de um cimento ósseo composto por uma mistura de DCPA e HAs substituídas (mais solúveis) associado à quitosana e a gelatina, pode resultar na obtenção de um material de enxertia que reúna boas propriedades mecânicas, melhores taxas de degradação e biocompatibilidade; além de um desempenho clínico e resistência à lavagem superior aos CFCs convencionais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar físico-quimicamente e avaliar o comportamento biológico *in vitro* de diferentes cimentos ósseos compostos, por uma fase em pó, constituída por HAs co-substituídas com Mg^{2+}/Sr^{2+} ou Zn^{2+}/Sr^{2+} e DCPA, associada a uma fase líquida contendo quitosana e gelatina bovina.

4.2 Objetivos específicos

- Sintetizar uma série de nHAs substituídas por Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} ou co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} ou Zn^{2+}/Sr^{2+} , pelo método de precipitação aquosa, em baixa temperatura e nas mesmas condições experimentais.
- Caracterizar e comparar as propriedades físico-químicas das diferentes HAs sintetizadas;
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade direta das partículas de HA sobre as linhagens de células fibroblásticas (L929) e osteoblásticas (MC3T3);
- Caracterizar físico-quimicamente os diferentes cimentos a base de HAs co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} ou Zn^{2+}/Sr^{2+} .
- Avaliar as propriedades de resistência à lavagem, molhabilidade, alterações de pH e tempo de presa dos cimentos obtidos;
- Avaliar o perfil de liberação de íons dos cimentos ósseos desenvolvidos;
- Avaliação *in vitro* da citotoxicidade indireta dos cimentos a base de HA sobre as linhagens de células fibroblásticas (L929), endoteliais (EA.hy926) e osteoblásticas (MC3T3);
- Avaliar a proliferação de células osteoblásticas MC3T3 mantidas em contato com os cimentos a base de HAs co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} ou Zn^{2+}/Sr^{2+} ;
- Avaliar o potencial angiogênico dos cimentos ósseos pela análise da formação de tubo por células endoteliais EA.hy926.

5 METODOLOGIA

5.1 Considerações éticas

O presente projeto de pesquisa foi estruturado em consonância com a Resolução n.º 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil e por se tratar de um estudo laboratorial *in vitro* não necessita de submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

5.2 Reagentes utilizados

O nitrato de cálcio tetra-hidratado (236,15 g/mol), o nitrato de estrôncio (211,63 g/mol), o cloreto de magnésio hexa-hidratado (203,3 g/mol) e o fosfato de cálcio bibásico anidro (136,06 g/mol) foram adquiridos da Synth (Brasil). O fosfato de amônio monobásico (115,03 g/mol) e a solução de hidróxido de amônio a 25% foram adquiridos da Merck (Alemanha). O nitrato de zinco (297,49 g/mol) foi proveniente da Dinâmica (Brasil). O cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 147,01 g/mol) e o fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 137,99 g/mol) foram adquiridos da Vetec (Brasil). O ácido láctico foi adquirido da Casa O.L.E.C. (Brasil). A gelatina bovina tipo B (50,000 - 100,000 g/mol) e a quitosana de baixo peso molecular (75% a 85% de desacetilação e 50,000 - 190,000 g/mol) foram adquiridas da Sigma Aldrich (EUA). A água deionizada foi proveniente de um sistema Milli-Q- Millipore (Millipore, EUA) e o fluido corporal artificial foi preparado fresco.

Para os testes de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens de células fibroblásticas de camundongo L929, de células endoteliais da veia umbilical humana EA.hy926 e de células osteoblásticas de camundongo MC3T3, obtidas pelo Banco do Rio de Janeiro (Brasil). A solução salina tamponada com fosfato (PBS) em pH 7,4 foi preparada fresca. O meio de cultura Dulbecco's Modificado Eagle Medium (DMEM), o soro fetal bovino, a solução antibiótica

(10.000 unidades / mL de penicilina, 10.000 µg / mL de estreptomicina) e o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) foram adquiridos da Life Technologies. O dodecil sulfato de sódio (LGC Biotecnologia, Brasil) e a Tripsina-EDTA (0,25%) foram provenientes da Sigma-Aldrich (EUA).

5.3 Síntese de Hidroxiapatita pura e com Diferentes Dopagens

A síntese de HA pura foi realizada pelo método de co-precipitação descrito por Cox *et al.* (2014), com modificações. Foram preparadas duas soluções, mantendo as proporções de Ca/P em 1,67:

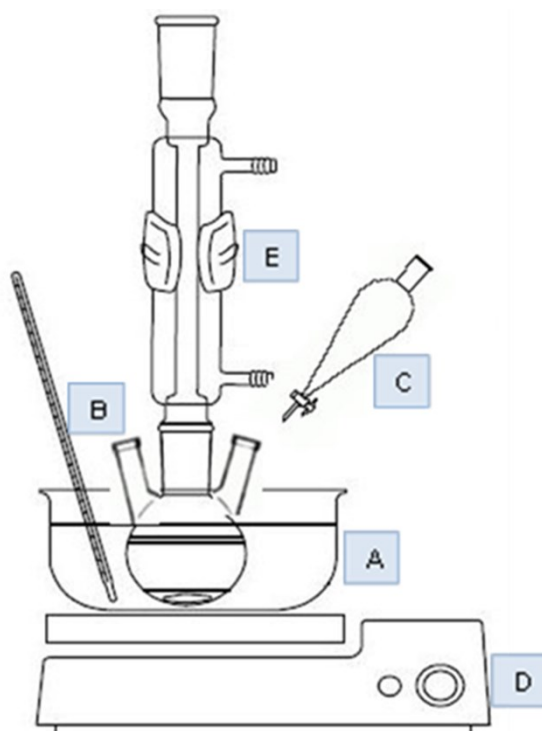
- Solução A – 0,04 M (4,6012 g) de fosfato de amônio monobásico ((NH₄)H₂PO₄) foram solubilizados em 150 mL de água deionizada sob agitação vigorosa.
- Solução B – 0,067 M (15,7512 g) de nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂·4H₂O) foram solubilizados em 120 mL de água deionizada sob agitação vigorosa.

Em seguida, o hidróxido de amônio a 25% foi adicionado, gota a gota, a solução A, até que o pH da mesma fosse ajustado para 11. Após, a solução B foi vertida em um balão de reação com três bocas, que foi acoplado a um condensador e mantida em banho de glicerina à temperatura de 100°C, em agitação magnética constante. Na sequência, a solução A foi colocada em um funil de separação e adicionada, gota a gota, à solução B. A mistura foi mantida sobre refluxo em banho de glicerina a 100°C, por 24 h em agitação constante. Decorrido esse tempo, o precipitado formado foi filtrado e lavado com água deionizada até atingir o pH 7. Após, o precipitado obtido foi submetido a um tratamento térmico de secagem em estufa a 100°C por 24 horas. Posteriormente, o precipitado foi macerado para pulverizar as partículas de HA. O processo de síntese das HAs está ilustrado na Figura 3.

As HAs substituídas foram sintetizadas utilizando a mesma técnica e condições idênticas de pH, tempo e temperatura. Foram sintetizadas HAs substituindo 5 e 10 % da molaridade do Ca²⁺ por Sr²⁺, Mg²⁺ ou Zn²⁺. Além

disso, foram sintetizadas HAs co-substituindo 5% (2,5% para cada íon) e 10 % (5% para cada íon) da molaridade do Ca^{2+} em $\text{Mg}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ ou $\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$. Nas sínteses das HAs substituídas também foram mantidas as proporções de $(\text{Ca}^{2+} + \text{íons}) / \text{P}$ igual a 1,67. Assim, quantidades adequadas de nitrato de estrôncio ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ou nitrato de zinco hexa-hidratado ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram adicionadas a solução contendo Ca^{2+} (solução B) para obter as substituições desejadas. Por exemplo, para obtenção da HA substituída com 5% de Mg^{2+} (HA-Mg5%), a solução B foi preparada contendo 95% em molaridade de nitrato de cálcio e 5% em molaridade de cloreto de magnésio. Assim, a proporção de nitrato de cálcio foi ajustada para cada substituição específica.

Figura 3. Esquema do processo de síntese da HA pelo método de co-precipitação.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Na primeira fase do trabalho foram sintetizados onze grupos de nHAs substituídas ou co-substituídas pelos íons Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} . Os grupos das diferentes nHAs obtidas estão listados na tabela 2, abaixo.

Tabela 2. Grupos de HAs sintetizadas pelo método de co-precipitação.

Grupo	Composição
HA-P	HA pura ou estequiométrica.
HA-Mg5%	HA substituída com 5% de Mg^{2+} .
HA-Mg10%	HA substituída com 10% de Mg^{2+} .
HA-Sr5%	HA substituída com 5% de Sr^{2+} .
HA-Sr10%	HA substituída com 10% de Sr^{2+} .
HA-Zn5%	HA substituída com 5% de Zn^{2+} .
HA-Zn10%	HA substituída com 10% de Zn^{2+} .
HA-SrMg2,5%	HA co-substituída com 2,5% de Sr^{2+} e 2,5% de Mg^{2+} .
HA-SrMg5%	HA co-substituída com 5% de Sr^{2+} e 5% de Mg^{2+} .
HA-SrZn2,5%	HA co-substituída com 2,5% de Sr^{2+} e 2,5% de Zn^{2+} .
HA-SrZn5%	HA co-substituída com 5% de Sr^{2+} e 5% de Zn^{2+} .

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

5.4 Caracterização físico-química das partículas de Hidroxiapatita

5.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia e o tamanho das partículas de HA foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão através do equipamento Tecnai-G-20 Super Twin FEI, com aceleração de 120 kV. Para preparação das amostras, as partículas de HA foram imersas em etanol e dispersas ao ultrassom por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram depositadas em grades de cobre revestidas com carbono. As médias dos comprimentos e das larguras das

partículas foram obtidas com o software Image J, tendo sido realizado um mínimo de 100 medidas.

5.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação morfológica das partículas de HA foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando o microscópio eletrônico de varredura (JEOL modelo JSM 6360 LV) com tensão de aceleração de 15 kV magnificação de 1000x. Para as análises, as amostras foram metalizadas com 3 nm de ouro. O espectromêtro acoplado a este microscópio foi utilizado para realizar a espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS), a fim de confirmar a presença de Mg, Sr e Zn. O EDS também foi utilizado para obter uma análise semi quantitativa da razão molar Ca/P e da razão (cátions + Ca) / P das nHAs sintetizadas (COX et al., 2014; SILVA et al., 2020). Para obter a quantificação dos elementos foram realizadas seis medidas de EDS em diferentes locais da amostra.

5.4.3 Espectroscopia de absorção atômica

A quantificação de Ca, Mg, Sr e Zn presente nas nHAs foi realizada também por espectroscopia de absorção atômica (Varian - Modelo AA240FS, Austrália). Para realizar as medições, 20 mg de cada amostra de nHA foi dispensada em uma mistura contendo 10 mL de água deionizada e 10 mL de solução nítrica ácida concentrada (65%). Para a dissolução completa das nHAs, a solução ácida foi aquecida a 250 °C até evaporar cerca de 2/3 da solução. Finalmente, o volume foi aumentado para 50 mL usando água deionizada, o pH foi ajustado para ~ 7 e as amostras foram submetidas a análise de espectrometria de absorção atômica. A substituição em mol (%) por Mg, Sr e Zn presente nas nHAs substituídas e co-substituídas foi calculada a

partir das medidas fornecidas pela espectroscopia de absorção atômica, de acordo com a relação abaixo (BIGI *et al.*, 2007):

$$\text{Substituição experimental mol (\%)} = \text{cátion} / (\text{cátion} + \text{Ca}) \times 100.$$

5.4.4 Difração de Raios-X de pó

A técnica de difração de raios-X foi utilizada para determinar a cristalinidade das HAs sintetizadas. Os difratogramas foram obtidos pelo aparelho da marca SHIMADZU, modelo XRD-7000 X-RAY (DQ-UFMG) utilizando tubo de cobre e radiação Cu K α ($\lambda=1,54051 \text{ \AA}$) operando a 30 kV e 30 mA. As análises foram feitas em ângulos de 2θ variando de 4 a 60 graus e velocidade de varredura de $4\theta \text{ min}^{-1}$.

O banco de dados do Centro Internacional de Dados de Difração (ICDD) foi utilizado em conjunto com o programa search-match para identificação das fases presentes nos difratogramas. Os padrões de difração da HA estequiométrica (ICDD - PDF # 01-074-0565) e do β -fosfatotricálcico (β -TCP / ICDD - PDF # 04-008-8714) foram comparados diretamente com os padrões de difração de raios X de todas as amostras para investigar a presença de picos característicos destes FC. Para todas as amostras de nHA, os parâmetros de rede, a e c, foram calculados utilizando respectivamente os picos de difração correspondentes aos planos (300) e (002) e usando a equação (1) (CHADA *et al.*, 2020):

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2}$$

Onde 'd' é o espaçamento interplanar e h, k, l são os índices de Miller. Após o cálculo dos parâmetros de rede os valores encontrados foram utilizados para estimar o volume da rede com a equação (2):

$$V = 0,866 a^2c$$

O tamanho do cristalito foi calculado com base nas medidas do pico de difração correspondente ao plano cristalográfico (002) da HA, usando a equação de Scherrer (3) (COX et al., 2014):

$$L = \frac{k \lambda}{\beta \cos \theta}$$

Onde L = tamanho do cristalito, K = constante de Scherrer dependente da forma do cristal (0,9), λ = comprimento de onda da radiação utilizada, β = é a largura da meia altura do pico em radianos (FWHM) e θ = ângulo de Bragg.

A cristalinidade é definida como a fração de fase cristalina em um volume de amostra. O grau de cristalinidade (X_c) dos nHAs foi calculado usando a seguinte equação (4):

$$X_c = \left(\frac{K_A}{B_{1/2}} \right)^3$$

Onde K_A é uma constante definida em 0,24 e $B_{1/2}$ é o FWHM do plano cristalográfico (002) em graus (REN et al., 2009).

5.4.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia na região do infravermelho é utilizada para identificar os grupos funcionais de uma amostra, uma vez, que o espectro infravermelho é constituído por bandas de absorção que correspondem às frequências de ligações dos átomos que compõem o material. A FT-IR foi realizada para investigar a composição das amostras de HA. Para esse fim os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados pelo espectrofotômetro Perkin Elmer GX com resolução de 4 cm^{-1} , do Departamento de Química da UFMG. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr, seco previamente e analisadas na região entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Os dados foram tratados pelo programa ACD/SpecManager 6.0, ACD/labs.

5.4.6 Análise térmica

A análise térmica ou termogravimetria (TG) é utilizada para medir a variação de massa em função da temperatura em uma atmosfera controlada sob um programa de aquecimento (OLIVEIRA, YOSHIDA e GOMES, 2011). A análise térmica das amostras de HA foi realizada com o equipamento DTG60 (Shimadzu, Japão modelo SDT Q600) do Departamento de Química/UFMG. As amostras foram aquecidas a uma razão de 10 °C/min até 600 °C sob fluxo de 50 mL/min de N₂. A razão de aquecimento foi de 10 °C min⁻¹, variando de 25 até 600 °C. Os dados obtidos foram plotados utilizando o programa OriginPro 7.0.

5.4.7 Espalhamento de luz eletroforético

A dispersão eletroforética de luz é uma técnica usada para medir a mobilidade eletroforética de partículas em dispersão. Esta técnica permite conhecer a carga gerada sobre a superfície das partículas, ou seja, o potencial Zeta. As medições de potencial Zeta foram feitas usando o equipamento Zetasizer ZS Nanoseries, Malvern instruments, usando cubetas de poliestireno (DTS 0112). Os valores de potencial zeta foram obtidos a partir da média de três medidas, sendo que para cada medida, foram realizadas 30 leituras. Foram preparadas dispersões nas concentrações de 1 mg·mL⁻¹ em água deionizada e pH igual a 7. Após 3 minutos de dispersão ao ultrassom foi retirado 1mL da suspensão de partículas para medições do Potencial Zeta das HAs.

5.4.8 Determinação da área superficial específica e distribuição do poro

A área superficial específica e a distribuição dos poros das amostras de HA foram determinadas a partir das isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio (N_2) pelo método de Brunauer-Emmet-Teller (BET). O teste de caracterização foi realizado pelo equipamento Quantachrome Autosorb IQ2 (DQ-UFMG). As amostras foram submetidas a vácuo para sua desgaseificação e aquecidas a $120^\circ C$ por 6 h, para eliminação de eventuais gases previamente adsorvidos na superfície. Em seguida, as amostras foram submetidas a um fluxo de nitrogênio gasoso e posteriormente imersas em banho de nitrogênio líquido em condições criogênicas ($T = -196^\circ C$). A distribuição dos diâmetros de poros foi obtida através da técnica de fisissorção de nitrogênio a 77K. A área superficial específica foi calculada empregando o método BET adotando uma faixa de pressão relativa (p/p_0) entre 0,03 a 0,3.

5.5 Propriedades dos cimentos ósseos

5.5.1 Composição

Os cimentos ósseos à base de HA são compostos por uma fase em pó e uma fase líquida. A fase em pó dos cimentos foi composta por 90% de HA e 10% de DCPA. O líquido foi constituído por uma solução aquosa contendo 2% de hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4 m/v), 2% de cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - m/v), 2% de β -glicerofosfato (m/v), 5% de quitosana (m/v) e 0,2% de gelatina bovina (m/v). A quitosana foi solubilizada com 0,5% de ácido láctico (v/v, $pH=5,2$) e após foi adicionado aos poucos uma solução de hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$) até que o pH fosse ajustado para 7. Após vários testes preliminares de consistência e manipulação dos cimentos, a relação de líquido/pó (L/P) foi fixada em 0,7 mL/g para execução dos experimentos. A massa de cimento foi preparada misturando o pó com o líquido manualmente, durante 90 s. A massa obtida foi inserida em diferentes moldes, para preparar as amostras utilizadas nos testes físico-químicos e biológicos dos cimentos desenvolvidos.

Tabela 3. Grupos dos cimentos ósseos desenvolvidos.

Grupo	Composição
C1	Cimento ósseo a base de HA pura
C2	Cimento ósseo a base de HA-SrMg2,5%.
C3	Cimento ósseo a base de HA-SrMg5%.
C4	Cimento ósseo a base de HA-SrZn2,5%.
C5	Cimento ósseo a base de HA-SrZn5%.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

5.5.2 Caracterização físico-química dos cimentos ósseos

A composição e estrutura dos cimentos ósseos desenvolvidos foram caracterizadas pelas técnicas de difração de raios-X de pó (SHIMADZU, modelo XRD-7000 X-RAY, tubo de cobre e radiação Cu $K\alpha=1,54051$, 30 kV e 30 mA) e absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (Espectrofotômetro Perkin Elmer GX com resolução de 4 cm^{-1}). Adicionalmente, foram realizadas análises térmicas dos cimentos ósseos (DTG60 - Shimadzu, Japão modelo SDT Q600).

5.5.3 Teste de presa

Os tempos de endurecimento inicial e final dos cimentos obtidos foram medidos usando agulhas Gillmore, de acordo com o Padrão ASTM C266-08 (SIEK et al., 2017). A fase em pó dos cimentos foi misturada a fase líquida por 90 s até formar uma pasta homogênea. A pasta de cimento foi inserida em um molde de silicone de 10 mm de diâmetro e 3 mm de altura. Após 120 s, uma agulha leve (113,4 g de peso e 2,12 mm de diâmetro) foi cuidadosamente colocada verticalmente sobre a superfície do cimento, durante 5s e a cada 1 minuto, para determinar o tempo de presa. O tempo de presa inicial foi definido

quando a agulha leve não foi capaz de deixar impressão na superfície do cimento. Seguindo os mesmos procedimentos, o tempo de presa final foi definido quando a agulha pesada (453,6 g em peso e 1,06 mm de diâmetro) não foi capaz de deixar impressão na superfície do cimento. As medidas dos tempos de presa dos cimentos foram realizadas em triplicata e em ambiente com 100% de umidade a 37 °C (LIU et al., 2013; TAHA et al., 2017).

5.5.4 Teste de pH

As medidas de pH foram realizadas imediatamente após o endurecimento dos cimentos. Amostras de (6 mm de diâmetro x 3 mm de altura) foram imersas em 6 mL de fluido corporal artificial (FCA) e mantidas a 37 °C. O FCA utilizado, nos experimentos deste trabalho, foi descrito por Kokubo e Takadama (2006) e possui uma composição semelhante à do plasma sanguíneo humano. O FCA continha 8,035g de NaCl, 0,355g de NaHCO₃, 0,225g KCl, 0,231g de K₂HPO₄·3H₂O, 0,311g de MgCl₂·6H₂O, 39 mL de ácido clorídrico na concentração de 1 mol/L (1.0_M-HCl), 0,292g de CaCl₂, 0,072g de Na₂SO₄ e 6,118g de tris-hidroximetil aminometano ((HOCH₂)₃CNH₂)(Tris) dissolvidos em água deionizada e tamponado a pH 7,4 com 1.0_M-HCl, para obtenção de 1000 mL de FCA. O valor do pH para cada amostra foi medido nos seguintes intervalos de tempo: 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos e após a cada 24h por 4 dias, usando um medidor de pH (MS TECNOPON, mPA-210, Brasil). O FCA foi substituído diariamente após cada medida de pH. Os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos pela média das medidas de cada amostra (LU et al., 2011; LEE et al., 2017).

5.5.5 Teste de resistência à lavagem

A resistência à lavagem dos cimentos ósseos foi avaliada por um método simples de perda de peso. Após a mistura das fases líquida e pó, as pastas obtidas foram inseridas em moldes de aço inoxidável para obtenção de amostras de cimentos de 6 mm de diâmetro e 10 mm de altura. Posteriormente

a presa final dos cimentos, as amostras foram individualmente desmoldadas, pesadas e imersas em 20 mL de FCA. Em seguida, os cimentos foram mantidos sob agitação mecânica a uma velocidade de 80 rpm / min a 37°C por 2 h. Finalmente, as amostras foram secas em forno a 70 °C por 1 h e novamente pesadas. Os testes foram realizados em triplicata, os valores médios foram calculados e o percentual de resistência à lavagem foi calculado de acordo com a seguinte equação (5):

$$\text{Perda massa (\%)} = \frac{(M_0 - M_1)}{M_0} \times 100$$

Onde, M₀ equivale à massa inicial da amostra e M₁ a massa final (Liu et al., 2016; LEE et al., 2017).

5.5.6 Molhabilidade

A molhabilidade é caracterizada pelo ângulo de contato, que é definido como o ângulo formado entre a tangente da interface líquido-vapor e à superfície sólida na linha de contato trifásica. Por convenção, o ângulo de contato é medido do lado do líquido. O ângulo de contato entre o líquido e a superfície dos cimentos desenvolvidos foi definido usando a equação de Young (6):

$$\cos \theta_{\text{young}} = \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma}$$

Onde θ Young é o ângulo de contato Young. O γ_{sv} e o γ_{sl} são respectivamente as interfaces de tensões, sólido-vapor e sólido-líquido. O γ a tensão superficial do líquido (HUHTAMAKI *et al.*, 2018).

Para realização do experimento foi utilizado o Sistema de Medição de Ângulo de Contato, modelo SEO Phoenix 300 Touch contact angle. Amostras de cimento (10 mm de diâmetro x 3 mm de altura) foram colocadas no suporte de amostras e a água foi gotejada na superfície para medir o ângulo de contato. Uma câmera registrou a imagem da queda da gota e o ângulo de

contato médio foi obtido usando o software Surfaceware9 (LETCHMANAN et al., 2017; LEI et al., 2019; DIAS et al., 2019).

5.5.7 Concentração de íons

As concentrações dos íons Ca, Mg, Sr e Zn, após imersão do cimento em água deionizada, foram medidas após 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias. Amostras dos cimentos (10 mm de diâmetro x 2 mm de altura) foram inseridas em 8 mL de água deionizada a 37 °C e a concentração dos íons foram determinadas por espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama (Varian – Modelo AA240FS, Austrália). Antes de cada aferição o líquido foi coletado e centrifugado a 1,400 rpm por 3 minutos para precipitação das partículas em suspensão. Em seguida, o líquido foi filtrado usando um papel Whatman® e armazenado para aferição. As medidas foram realizadas em triplicata e após cada tempo do experimento, a água deionizada foi renovada (ALKHRAISAT et al., 2013; TAHA et al., 2017; ELAHPOUR et al., 2018).

5.6 Testes biológicos *in vitro*

5.6.1 Preparação das amostras de Hidroxiapatita

Para realização dos testes de citotoxicidade direta das HAs sintetizadas, as células fibroblásticas L929 foram expostas ao contato direto com suspensões contendo meio de cultura e partículas de HA na concentração de 100µg/mL. As células pré-osteoblásticas MC3T3 foram expostas a essas suspensões nas concentrações de 100µg/mL e 200µg/mL. Para obter as suspensões, foram pesadas 2mg de cada amostra de HA em eppendorfs. Após, as partículas receberam radiação ultravioleta por 1 hora para desinfecção. Em seguida, 2mL do meio de cultura próprio para cada linhagem

de célula (L929 ou MC3T3) foram inseridos nos eppendorfs e as suspensões foram diluídas até atingir as concentrações de 100µg/mL ou 200µg/mL.

5.6.2 Preparação das amostras de Cimento Ósseo

A citotoxicidade indireta dos cimentos ósseos foi avaliada através do eluato (sobrenadante) dos mesmos. Para obtenção dos eluatos foram confeccionadas amostras (6mm de diâmetro x 4mm altura), que foram desinfetadas com radiação ultravioleta por 1 hora. Em seguida, cada amostra de cimento foi inserida individualmente em eppendorfs contendo 2 mL do meio de cultura próprio para cada linhagem celular utilizada e após, incubadas a 37°C por 24h.

5.6.3 Cultura de células

As linhagens de células fibroblásticas de camundongo L929 e de células endoteliais da veia umbilical humana (EA.hy926) foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm², no meio de cultura DMEM high-glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (0.1 mg/mL⁻¹ estreptomicina e 100 U/mL⁻¹ penicillina), sendo incubadas a 37°C em atmosfera com 95% de O₂ e 5% de CO₂.

A linhagem de células pré-osteoblásticas de camundongos MC3T3 foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm², no meio de cultura DMEM high-glucose suplementado com 20% de soro fetal bovino e antibióticos (0.1 mg/mL⁻¹ estreptomicina e 100 U/mL⁻¹ penicillina), sendo incubadas nas mesmas condições relatadas para as células L929 e EA-hy926. Essas linhagens de células foram subcultivadas para serem usadas nos testes *in vitro*.

5.6.4 Citotoxicidade direta

A biocompatibilidade das amostras de HA foi testada pelo teste do brometo de difenil tetrazólio (MTT). Após um mínimo de duas passagens, as linhagens de células L929 e MC3T3 foram subcultivadas até apresentar 80% de confluência. Em seguida, foram tripsinizadas, semeadas em placas de cultura de 96-well (densidade de 6×10^3 células/poço) e incubadas por 24 h. Após, o meio de cultura foi descartado e as células foram expostas a 100 μ L das soluções (contendo meio de cultura e nanopartículas de HA) por 24, 48 e 72 horas. Os grupos controles foram cultivados em meio de cultura sem a presença de HA. Decorrido os tempos de contato, os meios de cultura foram descartados e cada poço foi lavado, duas vezes, com 100 μ L de PBS. Em seguida, 90 μ L de DMEM sem vermelho de fenol e 10 μ L da solução de MTT (5 mg/mL em PBS) foram adicionados a cada poço para formar os cristais de formazan. As placas de 96-poços foram incubadas a 37°C por 4h, em atmosfera com 95% de ar e 5% de CO₂. Após, 100 μ L da solução de SDS (isopropanol acidificado na concentração de 1% em HCl) foram adicionados aos poços para solubilizar os cristais de formazan. Os testes foram realizados em hexaplicatas e a absorbância foi mensurada em comprimento de onda de 570 nm usando o espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan (MCC/340 spectrophotometer). A viabilidade celular foi calculada usando a seguinte equação (7):

$$\frac{D}{C} \times 100$$

Onde, D é o valor da média da densidade óptica de cada amostra de nHA e C é a média da densidade óptica do grupo controle.

Assim, a porcentagem relativa de células viáveis, presente nos grupos em teste, foi calculada considerando-se o grupo controle como 100% de viabilidade. A citotoxicidade celular foi classificada de acordo com o Padrão Internacional de Organização (ISO 10993-5) em: grau 0: viabilidade celular \geq 100%; grau 1: $75\% \leq$ viabilidade celular \leq 99%; grau 2: $50\% \leq$ viabilidade celular \leq 75%; grau 3: $25\% \leq$ viabilidade celular \leq 49%; grau 4: $1\% \leq$ viabilidade celular \leq 25% e grau 5: viabilidade celular = 0. Os graus 0 e 1 representam não

citotoxicidade e os graus 2, 3, 4 e 5 representam diferentes níveis de citotoxicidade (XIAO et al., 2018).

5.6.5 Citotoxicidade indireta

A citotoxicidade dos cimentos ósseos foi avaliada pelo teste do MTT. As células L929, MC3T3 e EA.hy926 foram subcultivadas até apresentar 80% de confluência. Em seguida, foram tripsinizadas, semeadas em placas de cultura de 96-poços (densidade de 6×10^3 células/poço) e incubadas por 24 h. Após, o meio de cultura foi descartado e estas linhagens celulares foram expostas a 100 μ L dos eluatos dos cimentos, por 24, 48 e 72 horas. Os grupos controles foram cultivados em meio de cultura sem a presença de eluato. Decorrido os tempos de contato, o teste de MTT foi realizado seguindo os mesmos procedimentos descritos acima, para o teste de citotoxicidade direta (DUAN et al., 2018).

5.6.6 Teste de Proliferação

Os corpos de prova (10 mm de diâmetro x 2 mm de altura) dos cimentos desenvolvidos foram desinfetados com radiação ultravioleta por 1 h. Após, cada amostra foi colocada individualmente nos poços das placas de cultura com 24-poços e imersas em meio de cultura DMEM high-glucose suplementado com 20% de soro fetal bovino e antibióticos (0.1 mg/mL⁻¹ estreptomicina e 100 U/mL⁻¹ penicillina) a 37 °C, por 3 h. Posteriormente, as células MC3T3 foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em de meio de cultura. Em seguida, 100 μ l da suspensão de MC3T3 (na densidade de $3,55 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas sobre as amostras. Adicionalmente, para os grupos controles foram semeados 100 μ l da suspensão de MC3T3 nos poços de cultura não contendo cimento. As placas de 24-poços foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 95% de O₂ e 5% de CO₂, por 3h. Após, 700 μ l do meio de cultura foi adicionado a cada poço para suplementar o volume final de 800 μ l. As placas foram incubadas por 1 e 4 dias a 37 °C e o

meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Decorrido os tempos do experimento, o meio de cultura foi aspirado e cada poço foi lavado com PBS estéril para remover as células não aderidas. Após, 360 μL de DMEM sem vermelho de fenol e 40 μL da solução de MTT (5 mg/mL em PBS) foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas a 37°C por 4h, em atmosfera com 95% de O_2 e 5% de CO_2 , no escuro. Posteriormente, 400 μL da solução de SDS foram adicionados aos poços. Após a solubilização dos cristais de formazan, 100 μL da solução de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços para medida da densidade óptica. Os testes foram realizados em triplicata e a absorbância foi mensurada em comprimento de onda de 570 nm usando o espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan (MCC/340 spectrophotometer). O gráfico de proliferação celular foi traçado, tendo o tempo de cultura como a abcissa e o valor de DO como a ordenada (XIAO et al., 2018; LEI et al., 2019).

5.6.7 Teste de formação de tubo

Para realização do teste de formação de tubos foram obtidos eluatos dos cimentos desenvolvidos. As amostras de cimento (6mm de diâmetro x 4mm altura) foram desinfetadas com radiação ultravioleta por 1 hora. Em seguida, cada amostra foi inserida individualmente em eppendorfs contendo 2 mL do meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e incubada a 37°C, por 7 dias. Após este período, 50 μL de Geltrex sem de fator de crescimento (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) foram adicionados a uma placa de 96 poços e incubado a 37°C por 30 minutos para geleificação. Simultaneamente, as células EA.hy926 foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspendidas em meio de cultura. Em seguida, 900 μl da suspensão de EA.hy926 (na densidade de 2×10^4 células/poço) foram inseridos em eppendorfs. Em sequência, 100 μL do eluato do cimento foi inserido ao eppendorf correspondente a sua amostra, para contato prévio com as células por 30 minutos. O grupo controle continha 900 μl da suspensão de EA.hy926 (na densidade de 2×10^4 células/poço) e 100 μL de meio de cultura. Decorrido o período de geleificação, o Geltrex foi

recoberto com 100 μ L da solução contendo a suspensão de células EA.hy926, pré-tratadas com eluato por 30 minutos. Após, a placa de 96-well foi incubada por 6 e 24 horas a 37°C. Os testes foram realizados em hexaplicata e a atividade de formação de tubo foi avaliada através da contagem do número de tubos formados. As imagens utilizadas para visualização dos capilares foram imagens fornecidas por microscópio óptico com magnificação de 10x. Após 24 horas de incubação, o número de estruturas semelhantes a tubos, presente em 3 poços selecionados aleatoriamente foram quantificados usando o software Image J (LU et al., 2014; Yu et al., 2017).

5.7 Análise estatística

Os resultados foram representados pela média e desvio padrão. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 5.3. A proliferação das células MC3T3 sobre os discos dos cimentos ósseos, e a citotoxicidade das partículas de HA e dos cimentos foram analisados por ANOVA de dois fatores e após, foi aplicado o teste Bonferroni para comparar as diferenças significativas entre os grupos. Os resultados do teste de formação de tubos foram avaliados por ANOVA de um fator, seguido do teste de Tukey para comparação entre os grupos. Todos os resultados foram representados ao nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

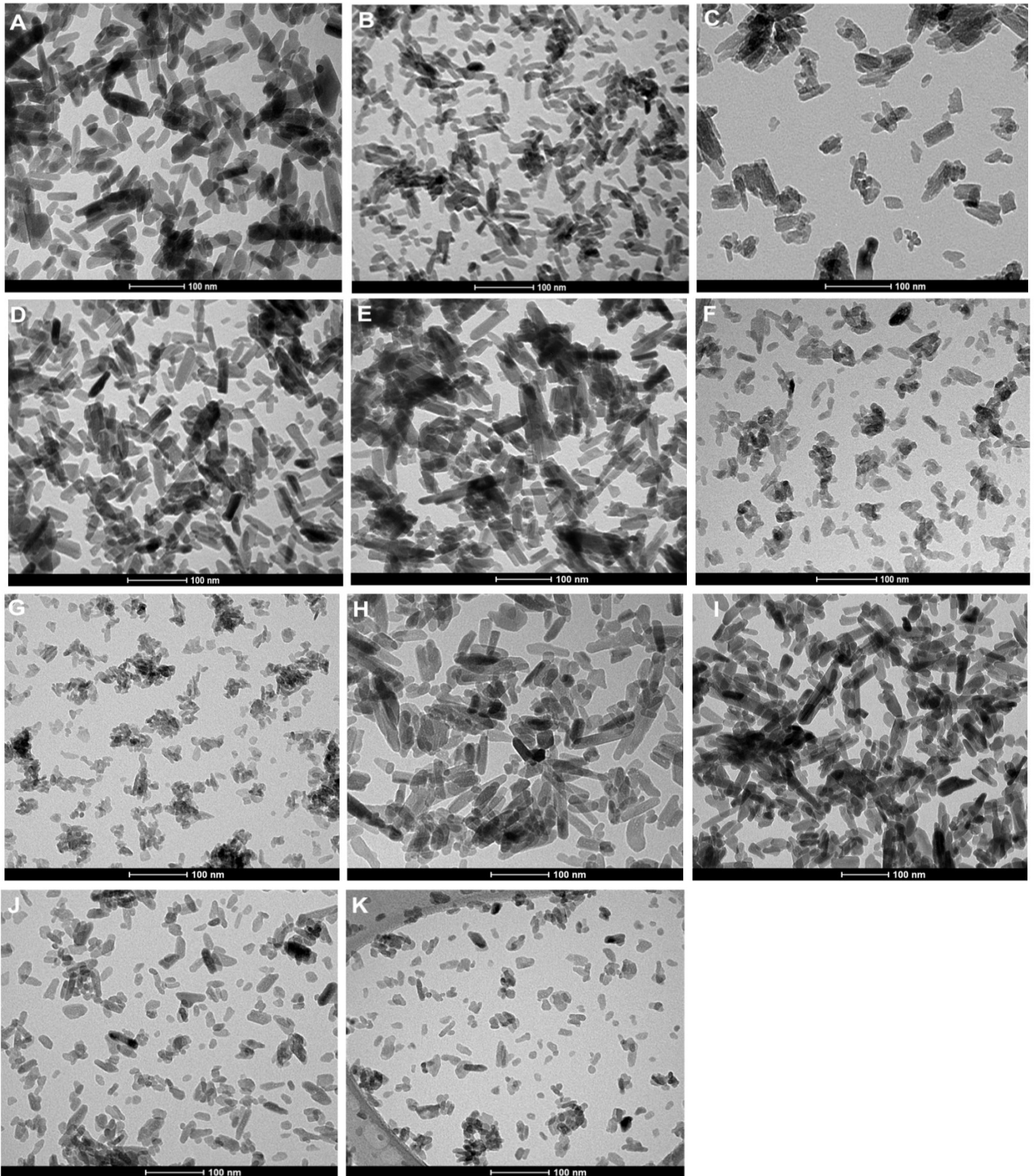
6.1 Caracterização físico-química das hidroxiapatitas

6.1.1 Morfologia e distribuição de tamanho das hidroxiapatias

As micrografias de MET foram obtidas para avaliar a morfologia, diâmetro e comprimento das HAs, revelando que o método de co-precipitação aquosa foi eficiente para sintetizar HAs em escala nanométrica. A literatura relata que as nanopartículas com comprimento entre de 1 a 10 nm possuem dimensões próximas do DNA, podendo causar efeitos tóxicos e mutagênicos (MEENA et al., 2012; OBERBEK et al., 2018). Assim, foi verificado se havia partículas de nHAs dentro dessa faixa de tamanho e não foi encontrado. A HA-P exibiu morfologia de nanocristal característica de bastonete, com comprimento e diâmetro médios de $35,9 \pm 9,7$ nm e $18,7 \pm 7,6$ nm, respectivamente.

As imagens de MET revelaram que quase todas as nanopartículas de HA tem formato de bastonete, com exceção das amostras HA-SrZn2,5% e HA-SrZn5% que exibiram uma mistura das formas, bastonete e esférica (Figura 4). De acordo com a literatura, o tamanho e a forma das partículas têm influência sobre suas características de toxicidade celular. Portanto, a obtenção de nHAs com morfologia esférica e de bastonete parece ser útil, pois essas formas foram associadas ao aumento da adesão célula-partícula e a menor citotoxicidade (ZHAO et al., 2013). Por outro lado, a morfologia das partículas de HA, também pode exercer influência sobre a produção de citocinas inflamatórias, sendo que as nHAs com formato esférico geram baixa resposta inflamatória (LEBRE et al., 2017).

Figura 4. Micrografias de MET das nHAs sintetizadas: (A) HA-P, (B) HA-Mg5%, (C) HA-Mg10%r5%, (D) HA-r5%, (E) HA-Sr10%, (F) HA-Zn5%, (G) HA-Zn10%, (H) HA-SrMg2,5%, I) HA-SrMg5%, J) HA-SrZn2,5%, K) HA-SrZn5%.



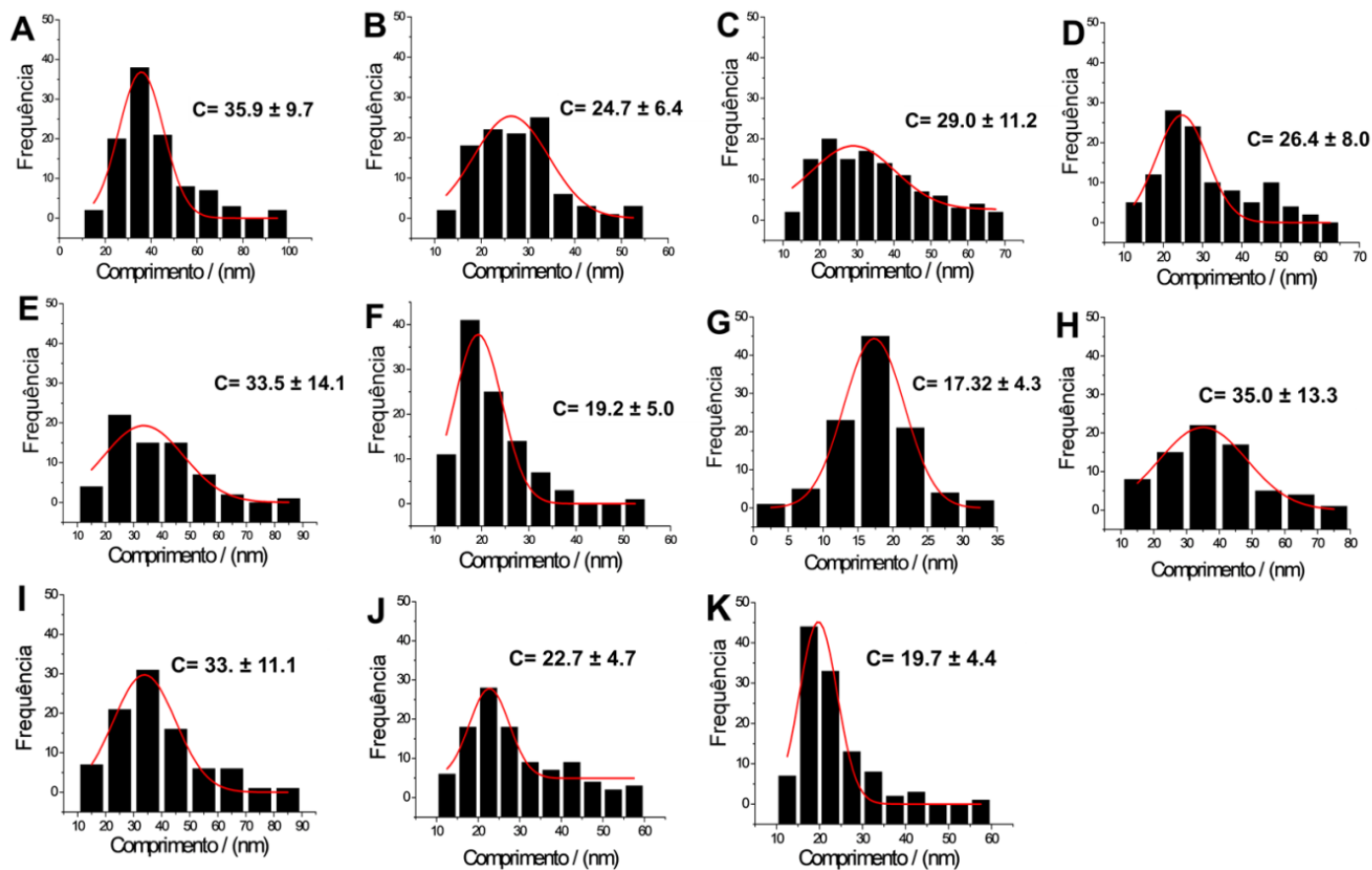
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A morfologia, o comprimento e diâmetro das partículas de HA variaram de acordo com a presença e o tipo de substituição (Figuras 5 e 6). Em geral, as substituições com 5% de Sr^{2+} ou Mg^{2+} resultaram na redução do comprimento e largura das partículas. No entanto, as partículas substituídas com 10% de Sr^{2+} ou Mg^{2+} e as nHAs co-substituídas por $\text{Mg}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ apresentaram distribuição irregular de tamanho, mas com comprimento e largura médios próximos ao da HA-P. Por outro lado, as nHAs substituídas e co-substituídas contendo Zn^{2+} exibiram comprimento e largura muito reduzido, quando comparado as outras amostras de HA. Esses resultados sugerem que, embora a incorporação de Mg e Sr possa resultar na redução do tamanho das partículas; a substituição com Zn parece gerar significativas modificações tanto de tamanho, como de forma das nanopartículas. Resultados semelhantes foram relatados por outras investigações que incorporaram Mg^{2+} , Sr^{2+} ou Zn^{2+} na estrutura da HA e obtiveram partículas de menor comprimento e largura, que a HA pura (CACCIOTTI *et al.*, 2009; FARZADI *et al.*, 2014; GAYATHRI *et al.*, 2018; GENG *et al.*, 2016; LOWRY *et al.*, 2017).

A síntese de nHAs de dimensões nanométricas pode ser vantajosa, pois 70% da matriz óssea é composta por HA nanocristalina (20 a 80 nm de comprimento e 2 a 5 nm de espessura). Nesse contexto, a obtenção de HAS sintéticas que mimetizam o tecido ósseo, tem um papel fundamental em estimular o crescimento celular e orientar a regeneração tecidual (ZHANG e WEBSTER, 2009).

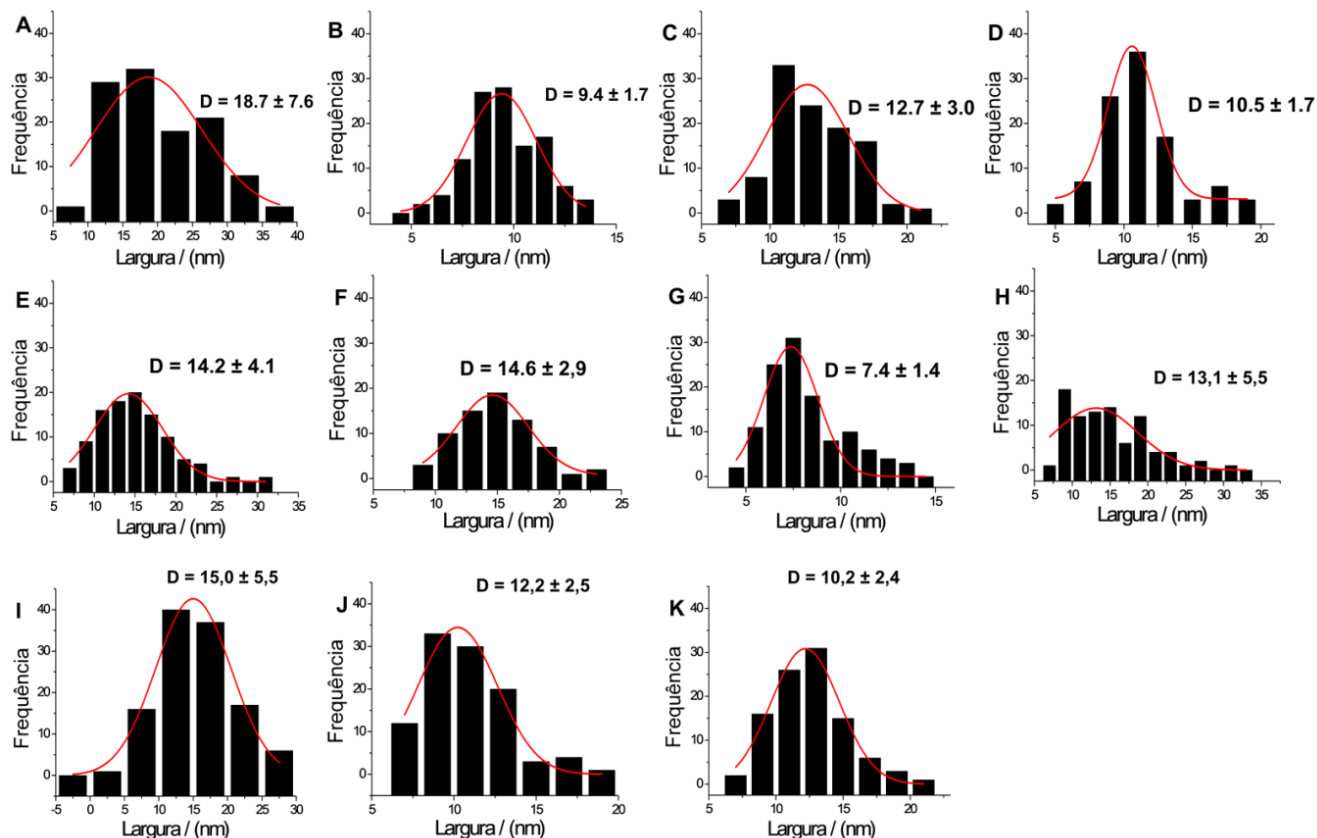
De fato, a literatura demonstra que os FC nanocristalinos degradam mais rapidamente que os FC de tamanho de micrométrico. Além disso, as nHAs possuem melhores propriedades que as HAs micrométricas, incluindo propriedades mecânicas aprimoradas, maior área de superfície, melhor adsorção de proteínas e a indução da atividade de osteoblastos (como adesão, proliferação e diferenciação) (AZIZEH-MITRA *et al.*, 2014; ZHANG e WEBSTER, 2009).

Figura 5. Histogramas de distribuição do comprimento das partículas de nHA: (A) HA-P, (B) HA-Mg5%, (C) HA-Mg10%, (D) HA-Sr5%, (E) HA-Sr10%, (F) HA-Zn5%, (G) HA-Zn10%, (H) HA-SrMg2,5%, (I) HA-SrMg5%, (J) HA-SrZn2,5%, (K) HA-SrZn5%.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 6. Histogramas de distribuição da largura das partículas de nHA: (A) HA-P, (B) HA-Mg5%, (C) HA-Mg10%, (D) HA-Sr5%, (E) HA-Sr10%, (F) HA-Zn5%, (G) HA-Zn10%, (H) HA-SrMg2,5%, (I) HA-SrMg5%, (J) HA-SrZn2,5%, (K) HA-SrZn5%.



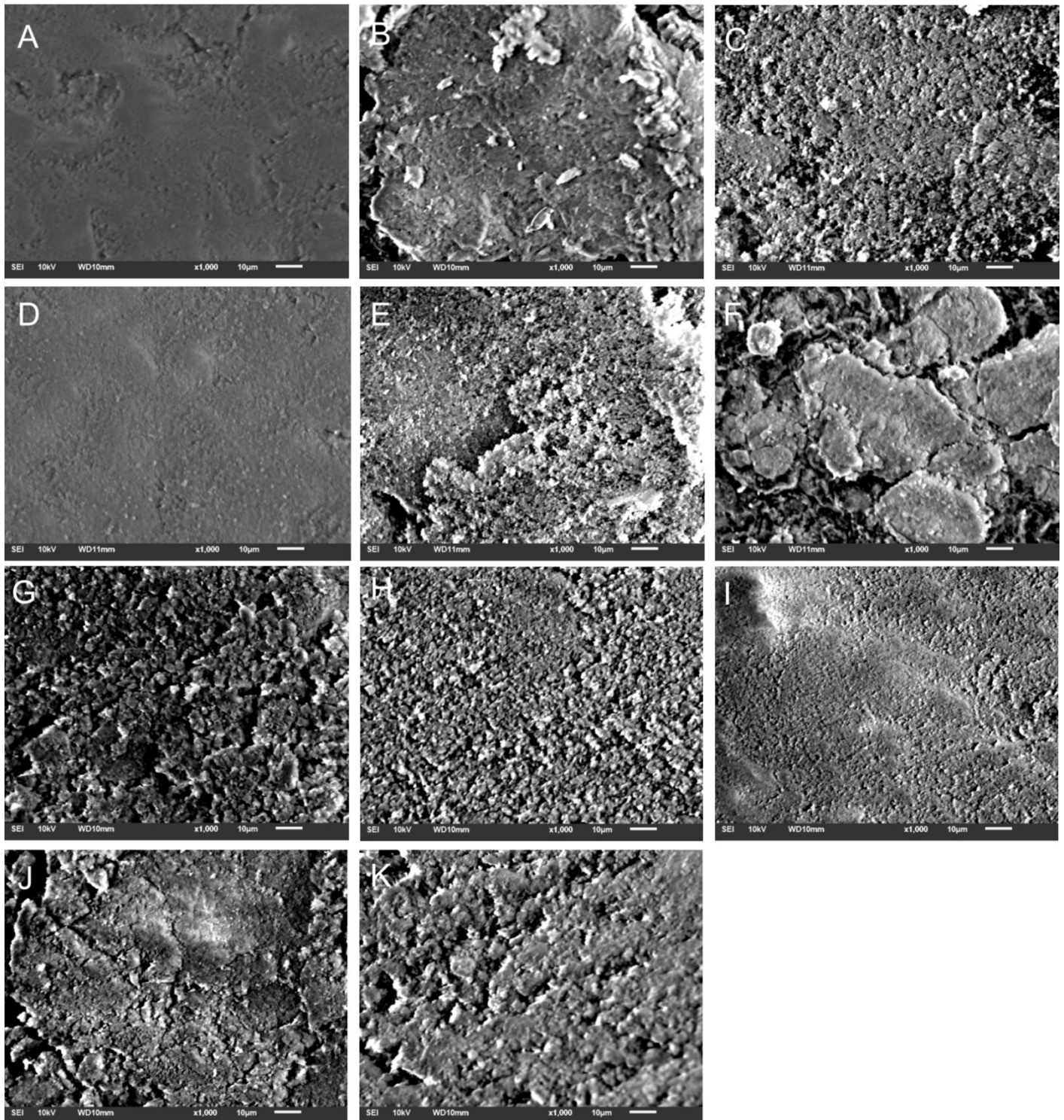
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

6.1.2 Morfologia da superfície e análise elementar das nHAs

A morfologia da superfície dos cristais das nHAs foi investigada através do MEV. As micrografias estão apresentadas na Figura 7 e revelam que os cristais estão agregados, formando uma superfície irregular, típica de nanopartículas de HA precipitada.

As imagens revelam que a substituição iônica modificou a morfologia da superfície das nHAs, gerando um aumento da irregularidade dessas superfícies. Outros estudos também demonstraram que a substituição da HA com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} alterou a morfologia da superfície dos cristais de HA (COX et al., 2014; GENG et al., 2016; AL-WAFI et al., 2017).

Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das nHAs, magnificações de 1000x. A: HA-P; B: HA-Mg5%; C: HA-Mg10%; D: HA-Sr5%; E: HA-Sr10%; F: HA-Zn5%; G: HA-Zn10%; H: HA-MgSr2,5%; I: HA-MgSr5%; J: HA-ZnSr2,5%; K: HA-ZnSr5%.

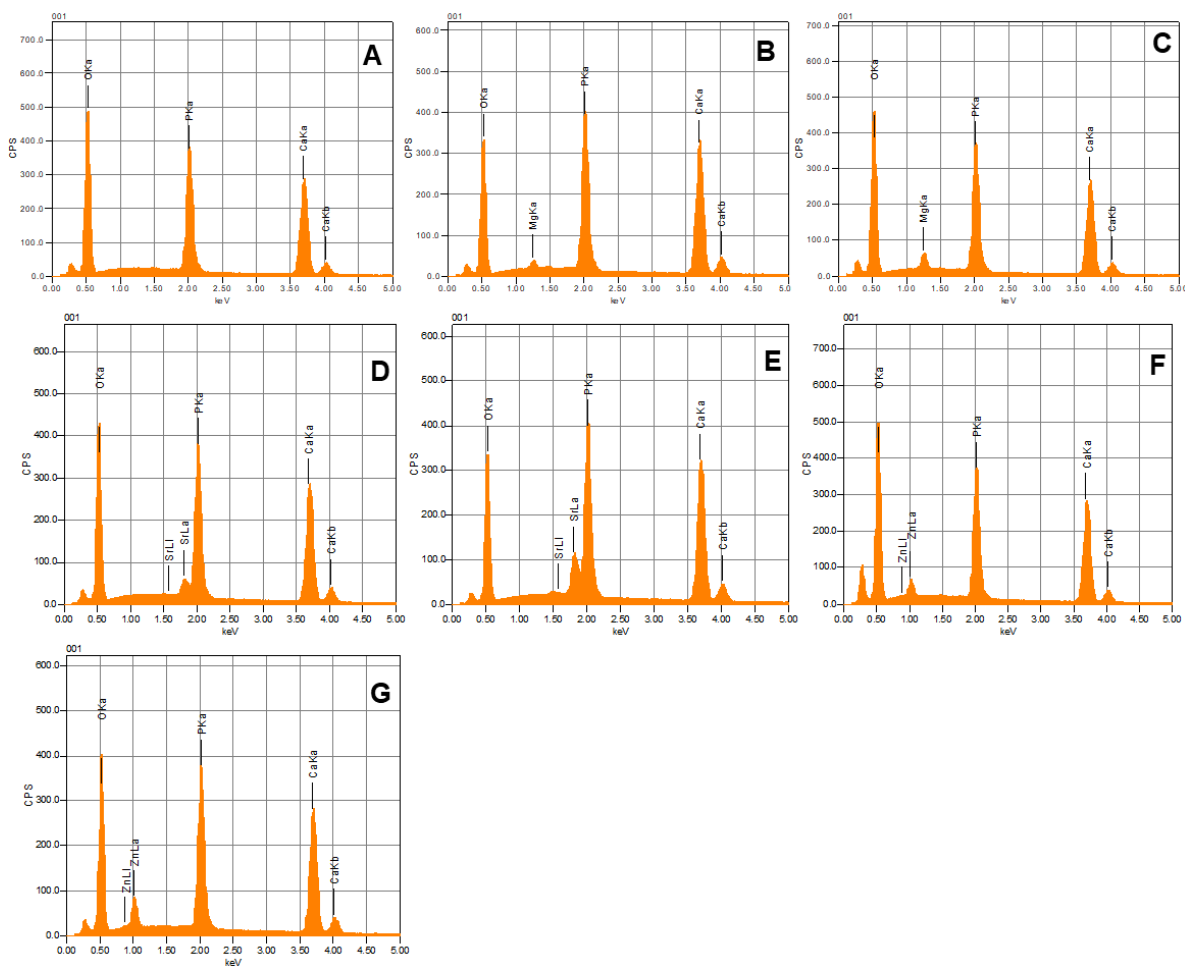


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O aumento da rugosidade da superfície das HAs pode facilitar a adsorção de proteínas e pode afetar a morfologia, distribuição e atividade metabólica das células MC3T3-E1 aderidas às superfícies de HAs (HE e SUN; DENG, 2020; RIBEIRO, SOUZA e MONTEIRO, 2010;). Assim, as alterações topográficas ocorridas nas nHAs substituídas pode melhorar sua capacidade de adsorção de proteínas e a adesão celular.

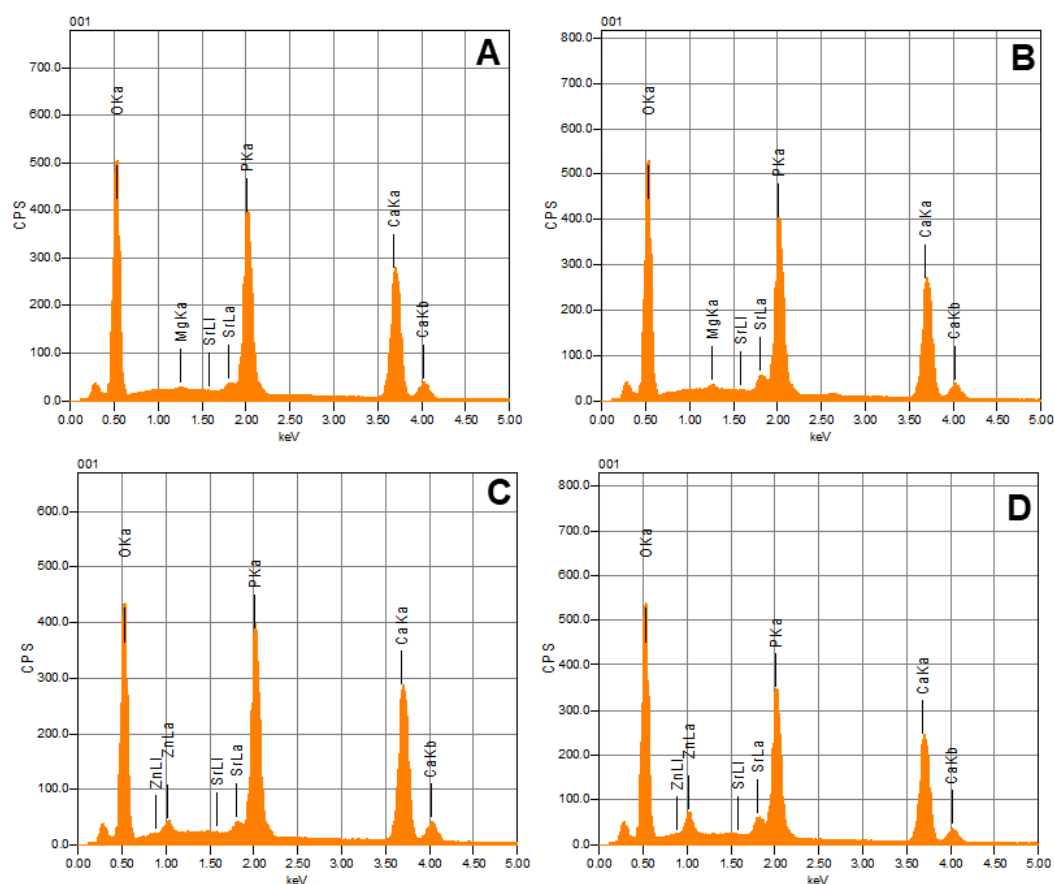
Os espectros de EDS identificaram apenas picos característicos dos elementos presente na composição das nHAs e dos metais utilizados como dopantes (Ca, P, O, Mg, Sr e Zn). Esses resultados mostraram que não havia a presença de contaminantes e que os respectivos cátions foram incorporados na estrutura das nHAs substituídas e co-substituídas (Figuras 8 e 9).

Figura 8. Espectro EDS das nHAs pura e substituídas. A: HA-P; B: HA-Mg5%; C: HA-Mg10%; D: HA-Sr5%; E: HA-Sr10%; F: HA-Zn5%; G: HA-Zn10%.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 9. Espectro EDS das nHAs co-substituídas. A: HA-SrMg2,5%; B: HA-SrMg5%; C: HA-SrZn2,5%; D: HA-SrZn5%.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A razão molar Ca/P e a razão (Ca + cátion) / P das nHAs foi calculada utilizando os dados fornecidos pela análise semi-quantitativa realizada por EDS (tabela 4). A relação Ca/P da HA-P foi de 1,66, ou seja, muito próxima da encontrada na HA estequiométrica (DOROZHKIN et al., 2016). Todas as nHAs substituídas apresentaram relação (Ca + M) / P menor que 1,67. Porém, a HA-Sr10% exibiu a mesma relação (Ca + M) / P da HA-P, indicando que a incorporação em 10% de mol de Sr não diminuiu a cristalinidade da nHA. De forma similar, Bigi et al. (2007) verificaram que, independente da quantidade de Ca e Sr, a incorporação do Sr na estrutura nanocristalina da HA manteve a relação Ca / P próxima da encontrada na HA estequiométrica.

Tabela 4. Resumo da relação Ca /P e das relações (Ca + M) / P das nHAs sintetizadas, calculado a partir da quantificação fornecida por EDS.

Amostra	Razão Ca:P	Razão (Ca+M):P
HA-P	1,66	N/A*
HA-Mg5%	1,64	1,65
HA-Mg10%	1,52	1,61
HA-Sr5%	1,57	1,62
HA-Sr10%	1,60	1,66
HA-Zn5%	1,59	1,63
HA-Zn10%	1,58	1,64
HA-SrMg2,5%	1,47	1,5
HA-SrMg5%	1,41	1,48
HA-SrZn2,5%	1,54	1,6
HA-SrZn5%	1,46	1,6

* Não se aplica.

M se refere ao cation utilizado na substituição.

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

As nHAs co-substituídas, particularmente as nHAs contendo $\text{Sr}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, apresentaram uma acentuada redução da relação $(\text{Ca} + \text{M}) / \text{P}$. Esses resultados sugerem que a substituição e co-substituição com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} pode resultar na formação de HADC, e que a redução da cristalinidade pode ser mais expressiva nas nHAs co-substituídas. Resultados semelhantes foram observados por outros autores. Gen et al. (2016) relataram que em HAs co-substituídas por $\text{Mg}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$, o aumento da concentração de Mg resultou em menores razões $(\text{Ca} + \text{Mg} + \text{Sr}) / \text{P}$. Além disso, Rajendran et al. (2018) demonstraram que a co-substituição com $\text{Mg}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ resultou na redução da razão $(\text{Ca} + \text{Mg} + \text{Zn} + \text{Co}) / \text{P}$.

Adicionalmente, os teores de Mg, Zn e Sr presentes nas nHAs foram determinados por espectrometria de absorção atômica. A partir dessas medidas foi calculada a substituição experimental em mol (%) dos íons dopantes (Tabela 5). Em geral, a porcentagem experimental de incorporação de Mg foi menor que a porcentagem de substituição teórica. Nas nHAs co-substituídas com $\text{Mg}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$, a baixa incorporação de Mg foi mais expressiva

quando comparada as nHAs substituídas com Mg^{2+} . Outros trabalhos, também reportaram que em HAs substituídas (SPTIPNIECE et al., 2014) e co-substituídas (IAFISCO et al., 2014; KULANTAHIVEL et al., 2015; GENG et al., 2016) a porcentagem de incorporação de Mg foi menor que a porcentagem teórica. De fato, a substituição de Ca por Mg na estrutura cristalina da HA é limitada, devido a grande diferença de tamanho entre os raios iônicos do Ca e Mg (LAURENCIN et al., 2011).

Tabela 5. Incorporação teórica e experimental em mol (%) dos íons Mg, Sr e Zn na rede cristalina das nHAs substituídas e co-substituídas.

Amostra	Dopante	Substituição teórica mol (%)	Substituição experimental mol (%)
HA-P	N/A*	N/A*	N/A*
HA-Mg5%	Mg	5	2,18
HA-Mg10%	Mg	10	5,36
HA-Sr5%	Sr	5	4,79
HA-Sr10%	Sr	10	9,83
HA-Zn5%	Zn	5	4,67
HA-Zn10%	Zn	10	9,92
HA-SrMg2,5%	Sr	2,5	2,24
	Mg	2,5	0,55
HA-SrMg5%	Sr	5	4,98
	Mg	5	0,90
HA-SrZn2,5%	Sr	2,5	2,5
	Zn	2,5	2,39
HA-SrZn5%	Sr	5	4,89
	Zn	5	4,74

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Por outro lado, as porcentagens de incorporação de Sr e Zn, nas nHAs substituídas e co-substituídas, são próximas ao percentual teórico de substituição. Em oposição, vários estudos mostraram que os níveis de Zn^{2+} incorporados na estrutura de HAs sintéticas foram inferiores aos níveis teóricos (BEGAM et al., 2017; GUERRA-LÓPES et al., 2015). Entretanto, outros autores reportaram que ocorreu significativa incorporação de Zn em mol% na rede da HA (FUJI et al., 2006; GROSS e KOMAROVSKA, 2013). Além disso, trabalhos anteriores relataram que a substituição do Ca por Sr na rede da apatita pode ser elevada ou até mesmo completa, com 100% de substituição (COX et al., 2014; GENG et al., 2016; LIN et al., 2008).

De fato, nas nHAs co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} , cerca de 1/5 da quantidade inicial de Mg e toda a quantidade inicial de Sr, entraram efetivamente na estrutura da apatita. Além disso, os níveis de incorporação do Mg foram menores nas nHAs co-substituídas, quando comparado as nHAs substituídas por esse cation. Esses resultados sugerem que durante a síntese das nHAs co-substituídas com Mg^{2+}/Sr^{2+} ocorreu uma ocupação preferencial dos sítios Ca por Sr e uma redução da incorporação de Mg. Iafisco et al. (2014) também demonstraram que nas HAs co-substituídas por Mg^{2+} e Sr^{2+} , o Sr entrou mais efetivamente na estrutura da apatita.

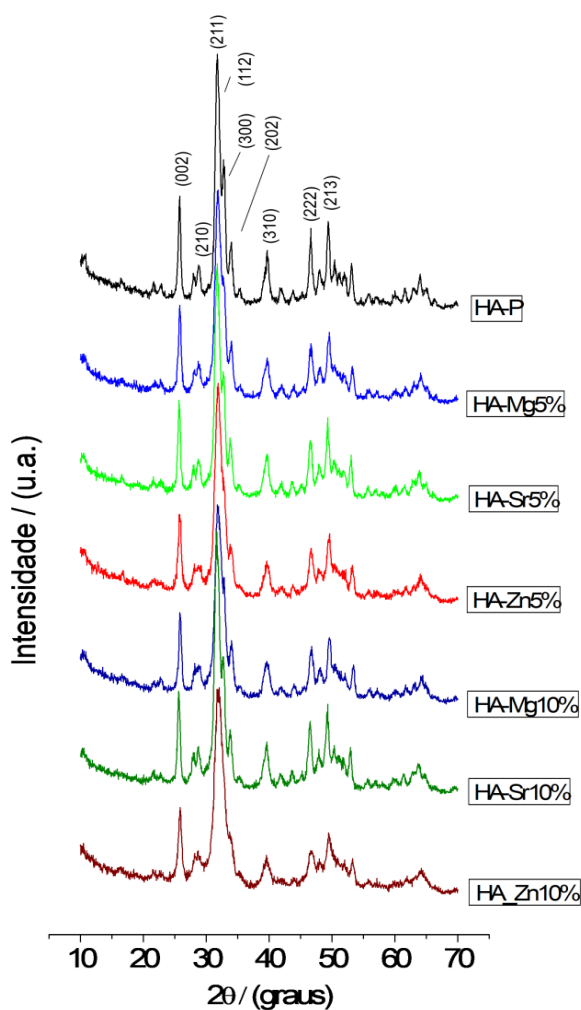
6.1.3 Difração de Raios-X de pó

Os padrões de DRX das nHAs substituídas e co-substituídas foram comparados com os padrões do banco de dados ICDD para HA estequiométrica (PDF # 01-074-0565) e β -TCP (PDF # 04-008-8714). Nas Figuras 10 e 11 estão representados, respectivamente, os difratogramas de raios-x das nHAs pura e substituída com um metal (Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+}) e os difratogramas de raios-x das nHAs pura e co-substituída com Sr^{2+}/Mg^{2+} ou com Sr^{2+}/Zn^{2+} . Os difratogramas de todas as amostras de nHA exibiram picos alargados e característicos da HA indicando um baixo grau de cristalinidade, típico da HA precipitada (COX et al., 2014). No entanto, nenhum pico característico do β -TCP foi encontrado. De forma similar, outros estudos que

descreveram a síntese de HAs substituídas com Mg, Sr e/ou Zn em baixa temperatura, não encontraram outras fase de FC (BIGI *et al.*, 2007; COX *et al.*, 2014; FRASNELLI *et al.*, 2016; IAFISCO *et al.*, 2014; REN *et al.*, 2009). No entanto, a literatura relata que quando as HAs substituídas são submetidas a tratamento térmico acima de 750 °C pode ocorrer a conversão térmica parcial da HA em β -TCP substituído (GUERRA-LÓPES *et al.*, 2015).

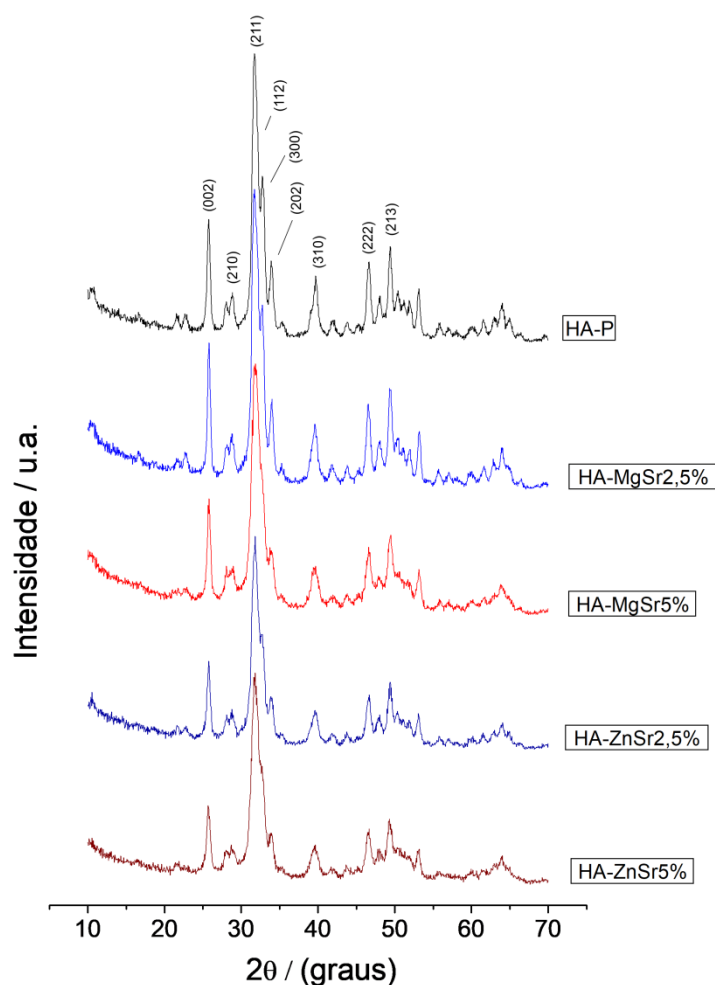
A HA-P apresentou picos de difração consistentes com os da HA estequiométrica, em valores de 2θ e planos correspondentes em: 25,68° (002), 28,85° (210), 31,80° (211), 32,81° (112), 33,85° (300), 39,77° (310), 46,71° (222) e 49,40° (213).

Figura 10. Difratogramas de Raios-x das Hidroxiapatitas pura e substituídas com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} .



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 11. Difratogramas de Raios-x das Hidroxiapatitas pura e co-substituídas com $\text{Sr}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ou $\text{Sr}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$.



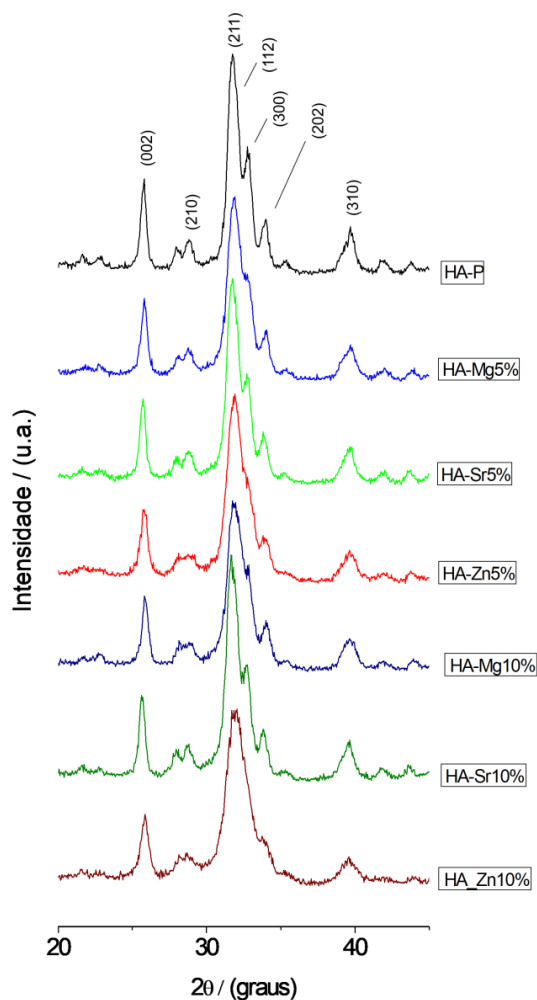
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

No entanto, os difratogramas indicam que a substituição do cálcio resultou em diferentes alterações da rede cristalina da HA, variando de acordo com o tipo de metal utilizado na substituição (Figuras 12). As nHAs substituídas com Mg^{2+} ou Zn^{2+} apresentaram redução da intensidade e alargamento dos picos correspondentes aos planos 210, 112 e 300. Esses dados sugerem que a substituição com esses cátions reduziu o grau de cristalinidade das nHAs. Em acordo com esses resultados, outros autores relataram que HAs substituídas com Mg^{2+} (CACCIOTTI et al., 2009; FARZADI et al., 2014; GAYATHRI et al., 2018) e Zn^{2+} (ANWAR et al., 2016; BEAGAM et al., 2017; GUERRA-LÓPEZ et

al., 2015; REN et al., 2009) exibiram baixa cristalinidade e picos de difração alargados.

Por outro lado, comparado a HA-P, as nHAs substituídas com Sr^{2+} exibiram picos de DRX mais intensos, indicando que a substituição do Ca^{2+} por Sr^{2+} gerou um aumento da cristalinidade da nHA. Resultados semelhantes foram relatados por Lin et al. (2008) e Al-Wafi et al. (2017). De fato, a adição de Sr^{2+} pode levar ao aumento da intensidade dos picos de difração, porque o Sr^{2+} é mais pesado e contém mais elétrons do que o Ca^{2+} , dispersando mais efetivamente os raios-x e gerando um aumento na cristalinidade da HA (O'DONNELL *et al.*, 2008).

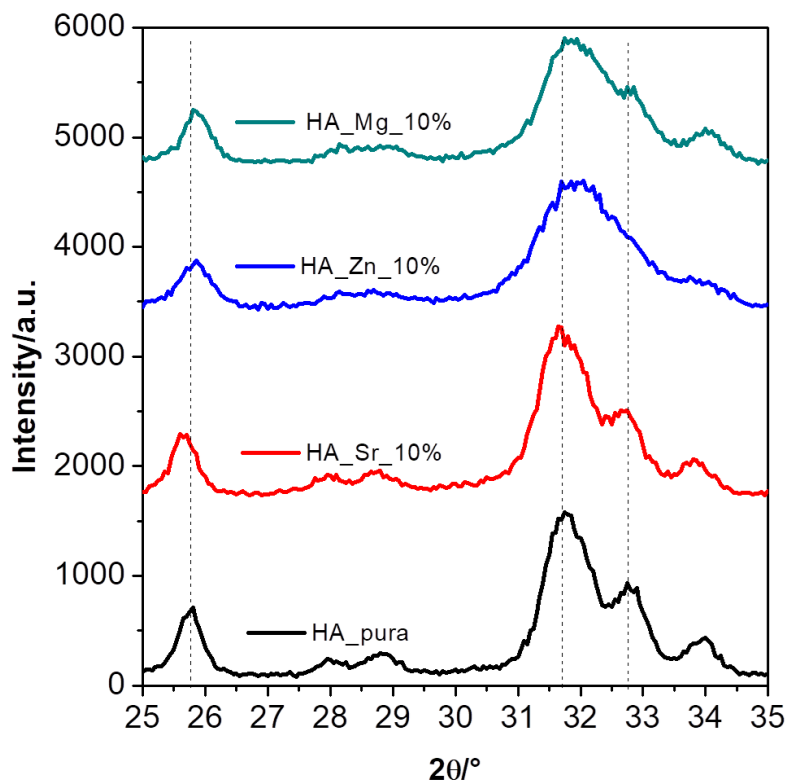
Figura 12. Difratomogramas de Raios-x detalhados, em 2θ entre 20° e 40° , das nHAs pura e substituídas com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} .



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Os picos de difração das nHAs substituídas exibiram um pequeno deslocamento em 2θ , em comparação com a HA-P. Os picos de DRX das nHAs substituídas com Mg^{2+} e Zn^{2+} sofreram um pequeno deslocamento em direção a ângulos de difração mais altos, sugerindo que essas substituições resultaram em distorções da rede da HA. Por outro lado, os picos das nHAs substituídas com Sr^{2+} se deslocaram em direção a ângulos de difração mais baixos, indicando que a substituição com Sr gerou uma expansão da rede cristalina das nHAs (Figura 13). Em relação, as nHAs co-substituídas, apenas a HA-SrMg2,5% sofreu um deslocamento similar ao exibido pelas nHAs substituídas com Sr^{2+} . Todas as outras nHAs co-susbtituídas sofreram um deslocamento para ângulos de difração mais altos, sugerindo que nessas amostras o efeito do Mg ou Zn pode ter sido mais pronunciado que o do Sr. Os autores também relataram que a substituição da HA resultou no deslocamento dos picos de difração (BOYD et al., 2015; CHADHA et al., 2020; IAFISCO et al., 2014; LOWRY et al., 2017; SINGH, SINGH e BATRA, 2015;).

Figura 13. Difratomogramas de Raios-X detalhados das amostras de HA-P, HA-Mg10%, HA-Sr10% e HA-Zn10% evidenciando o deslocamento dos picos de difração que foram observados nos difratogramas das nHAs substituídas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Todas as alterações descritas acima estão relacionados a diferenças de tamanho entre os raios iônicos do Mg (0,065 nm), Zn (0,074 nm) e Sr (0,118 nm) com o Ca (0,099 nm) (KAYGILI e KESER, 2015). Como os raios iônicos do Mg e Zn são próximos e menores que o do Ca, espera-se que eles afetem a estrutura cristalina da HA de maneira semelhante. No entanto, como o raio iônico do Sr é maior que o do Ca, sua incorporação pode gerar uma expansão da rede cristalina da HA.

De fato, as alterações visualizadas no difratogramas podem ser correlacionadas com as mudanças ocorridas nos parâmetros de rede das nHAs (resumidos na tabela 6). Os parâmetros de rede a e c exibidos pela HA-P foram menores que o da HA estequiométrica ($a= 9,4218$ e $c= 6,884$). Por outro lado, as nHAs substituídas e co-substituídas exibiram um aumento do parâmetro de rede a, indicando que de fato ocorreu a substituição local do Ca^{2+} pelos cátions descritos nesse trabalho. Nas nHAs substituídas por Mg^{2+} e Zn^{2+} a incorporação do cátion gerou um aumento do parâmetro de rede a, acompanhado da diminuição do parâmetro de rede c. Outros estudos relataram alterações semelhantes em HAs substituídas com Mg (BIGI et al., 2007; FARZADI et al., 2014; PREDOI et al., 2019) e Zn (GUERRA-LÓPES et al., 2015, REN et al., 2009). No entanto, as distorções da estrutura cristalina da HA parecem ter sido mais pronunciadas nas nHAs substituídas com Sr^{2+} , porque ocorreu uma expansão tanto do volume da célula unitária como dos parâmetros de rede a e c, demonstrando que para essas nHAs ocorreu um aumento da cristalinidade.

Essas alterações são comprovadas pelos resultados do grau de cristalinidade (X_C) das nHAs. Todas as amostras exibiram baixo grau de cristalinidade, o que pode estar relacionado à baixa temperatura de síntese das mesmas. Esses dados estão de acordo com a razão Ca / P das nHAs e resultados semelhantes foram relatados por outros estudos que sintetizaram HAs em condições de temperatura semelhantes (AL-WAFI et al., 2017; IAFISCO et al., 2014; REN et al., 2009;). Além disso, como esperado, o grau de cristalinidade foi afetado pelo tipo de substituição catiônica. Em geral, a substituição com Sr gerou um aumento do grau de cristalinidade, tanto para as nHAs substituídas como para as nHAs co-substituídas. Por outro lado, a

presença de Zn resultou em uma elevada redução do grau de cristalinidade e as nHAs contendo Mg sofreram uma ligeira redução de cristalinidade.

Somado a isso, as nHAs substituídas com Mg sofreram uma ligeira redução do tamanho dos cristalitos; enquanto as nHAs substituídas por Zn exibiram uma redução mais pronunciada. Por outro lado, o tamanho do cristalito das nHAs substituídas com Sr foi similar ao da HA-P. Esses resultados estão em concordância com as alterações visualizadas nos difratogramas das nHAs substituídas com Mg^{2+} e Zn^{2+} , pois o alargamento dos picos de difração está relacionado com a redução do tamanho dos cristalitos (BEGAM et al., 2014).

Tabela 6. Parâmetros da rede das amostras de nHA, incluindo os parâmetros de rede a, c, volume da célula unitária (V), tamanho médio do cristalito (D) e grau de cristalinidade (X_c).

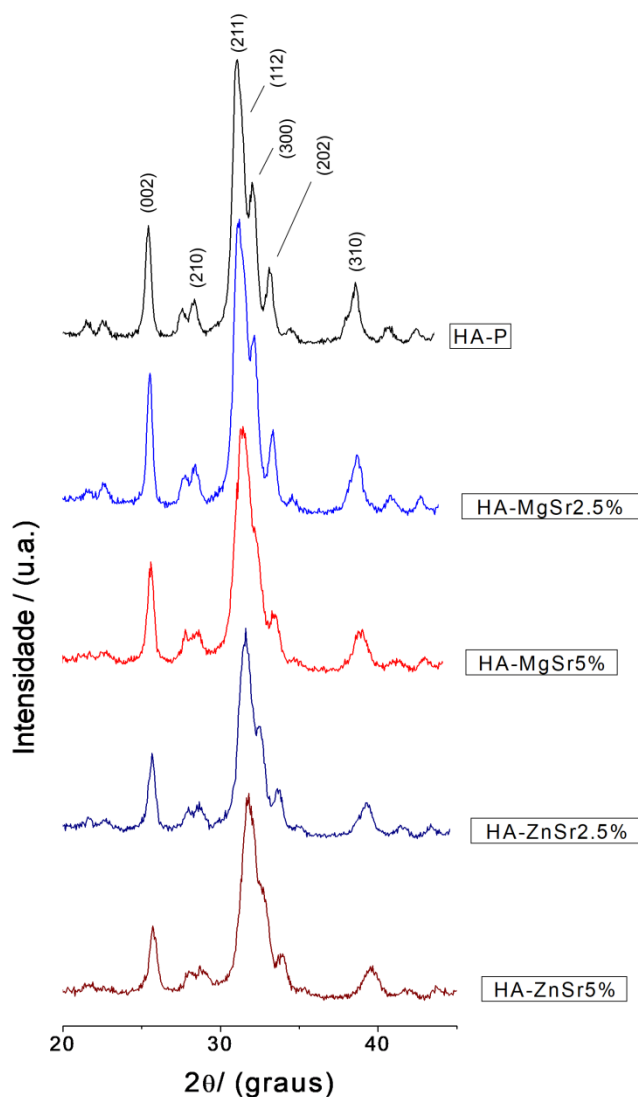
Amostra	D (nm)	a =b (Å)	c (Å)	V (Å) ³	X_c
HA-P	18,61	9,4090	6,8672	526,49	0,1298
HA-Mg5%	16,72	9,4144	6,8549	526,15	0,1195
HA-Sr5%	18,22	9,4220	6,8807	528,98	0,1544
HA-Zn5%	15,15	9,4276	6,8559	531,30	0,0889
HA-Mg10%	17,06	9,4114	6,8375	524,48	0,1257
HA-Sr10%	18,23	9,4314	6,8924	530,94	0,1547
HA-Zn10%	13,90	9,4314	6,8449	527,28	0,0685
HA-MgSr2,5%	19,71	9,4268	6,8591	527,86	0,1956
HA-ZnSr2,5%	16,58	9,4314	6,8675	529,02	0,1168
HA-MgSr5%	19,21	9,4367	6,8548	528,64	0,1813
HA-ZnSr5%	15,60	9,4276	6,8723	528,97	0,0971

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O efeito da co-substituição na cristalinidade das nHAs também variou de acordo com os dopantes e pode ser visualizado na Figura 14, que apresenta os

difratogramas detalhados das nHAs co-substituídas. Comparada a HA-P, as nHAs co-substituídas apresentaram redução de intensidade e alargamento dos picos de difração. Essas alterações foram menos acentuadas nas nHAs co-substituídas com $\text{Sr}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, mas aumentaram progressivamente a medida que os percentuais de substituição aumentaram.

Figura 14. Difratogramas de Raio x detalhados, em 2θ entre 20° e 40° , das Hidroxiapatitas pura e co-substituídas com $\text{Sr}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ou $\text{Sr}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Somado a isso, a redução da intensidade dos picos de difração foi menos pronunciada nas nHAs co-substituídas, quando comparado as nHAs

substituídas por Mg^{2+} e Zn^{2+} , indicando que o Sr^{2+} pode ter um efeito estabilizador na rede cristalina das nHAs co-substituídas. Em concordância com isso, os parâmetros de rede das nHAs co-substituídas com Sr^{2+}/Mg^{2+} demonstram que a presença do Sr resultou em aumento do tamanho do cristalito, do volume da célula unitária e do grau de cristalinidade, sendo que o oposto foi encontrado para as nHAs substituídas por Mg^{2+} . Além disso, nas nHAs co-substituídas com Sr^{2+}/Zn^{2+} houve um aumento dos parâmetros de rede a e c, além de uma menor redução do tamanho do cristalito e do grau de cristalinidade, quando comparado as nHAs substituídas por Zn^{2+} .

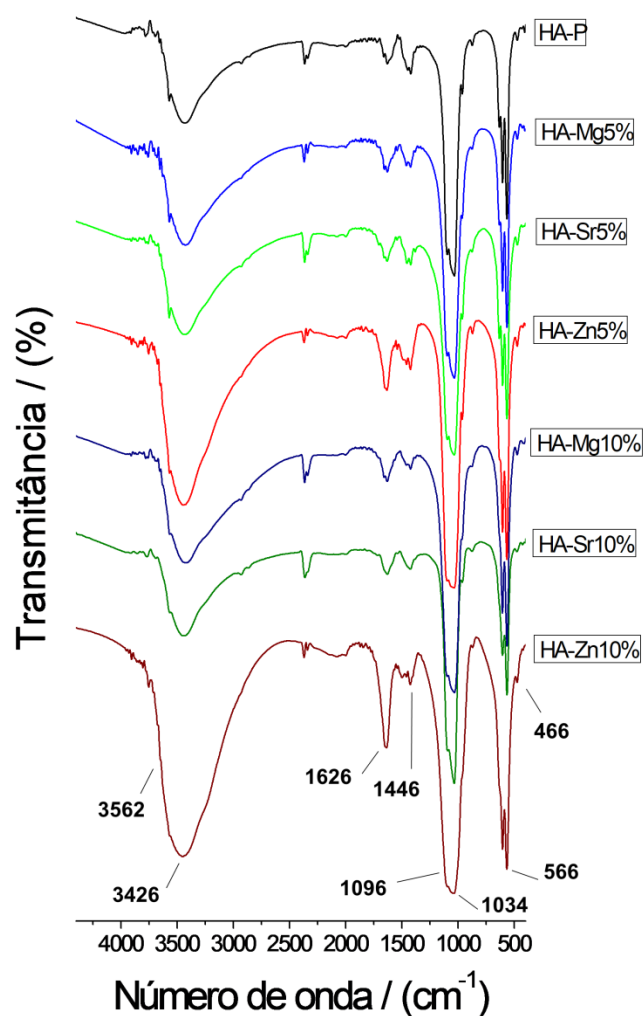
As análises das micrografias de transmissão revelou que para todas as amostras de nHA, os tamanhos das nanopartículas foram diferentes dos tamanhos dos cristais calculados com base nos resultados de DRX. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que uma partícula observada no MET é o resultado da agregação de vários pequenos cristalitos (PREDOI et al., 2019).

6.1.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A FT-IR foi realizada para investigar os efeitos da substituição catiônica sobre os grupos funcionais da HA. Os espectros das nHAs substituídas e co-substituídas estão respectivamente representados nas Figuras 15 e 16 e demonstram que as nHAs sintetizadas apresentam bandas de absorção características da HA. O espectro da HA-P mostra em 3562 cm^{-1} a banda de absorção característica do modo de estiramento simétrico do grupo OH^- da HA. A banda mais larga entre 3698 e 2448 cm^{-1} com pico mais intenso em 3426 cm^{-1} pode ser atribuída à água adsorvida. A banda de absorção em torno de 1626 cm^{-1} é referente ao modo de deformação das moléculas de água. As bandas em 1446 cm^{-1} e em 872 cm^{-1} são atribuídas à presença de CO_3^{2-} . As bandas intensas que aparecem em 1096 cm^{-1} e em torno de 1034 cm^{-1} são atribuídas ao modo de estiramento assimétrico dos fosfatos (PO_4^{3-}) e a banda em 960 cm^{-1} é relativa ao estiramento simétrico dos fosfatos (PO_4^{3-}). As bandas presentes em torno de 636 cm^{-1} são atribuídas ao modo vibracional dos íons OH^- e as

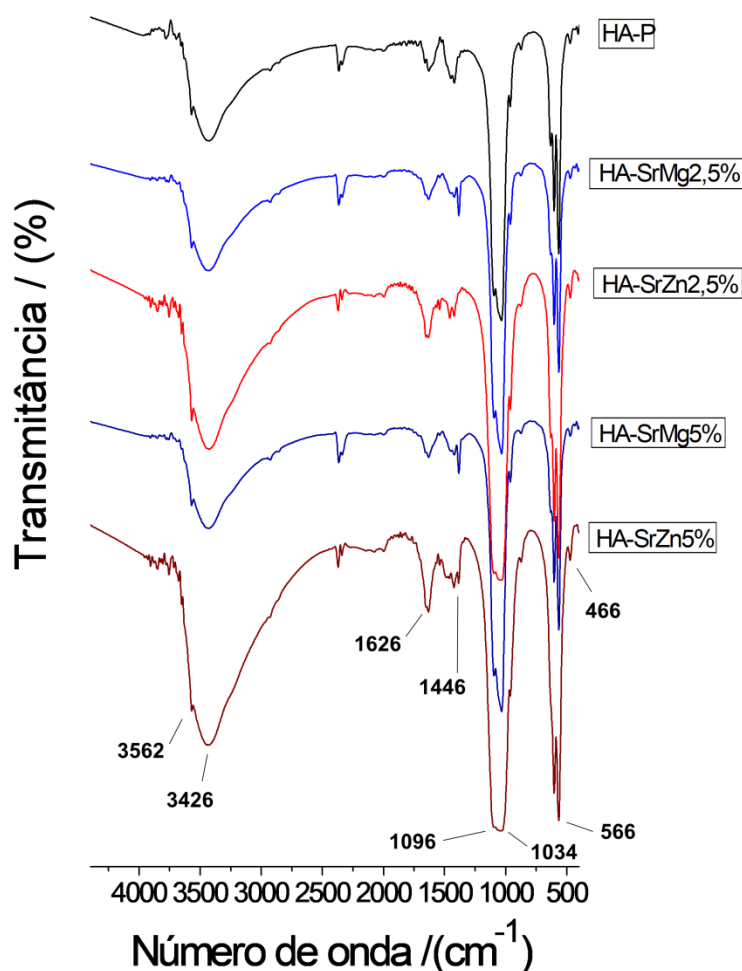
bandas em 602 cm^{-1} e 566 cm^{-1} são relativas ao modo de deformação assimétrica dos fosfatos (PO_4^{-3}). A banda de intensidade fraca em 466 cm^{-1} é devido ao modo de deformação simétrica do (PO_4^{-3}) (AL-WAFI *et al.*, 2017; BEGAM *et al.*, 2017; BOYD *et al.*, 2015; FARZADI *et al.*, 2014).

Figura 15. Espectros FITR das nHAs pura e substituídas com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} .



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 16. Espectros FITR das nHAs pura e co-substituídas com Mg^{2+}/Sr^{2+} e Zn^{2+}/Sr^{2+} .



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

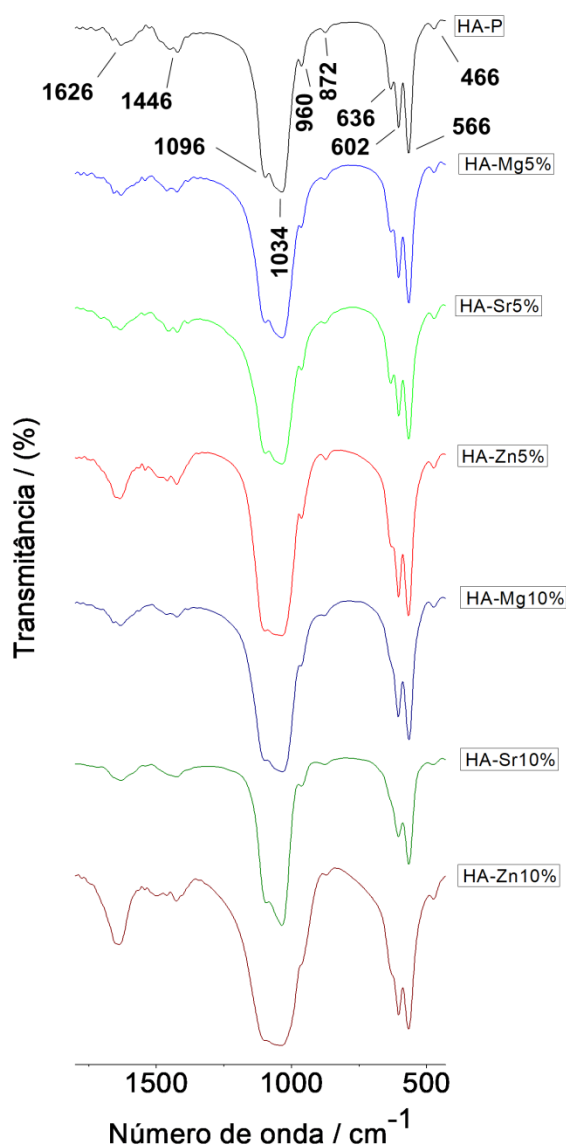
Os espectros de FTIR das nHAs, substituídas e co-substituídas, são semelhantes a da HA-P. Porém ocorreram deslocamentos e algumas mudanças na intensidade das bandas de absorção. As nHAs substituídas ou co-substituídas que continham Zn^{2+} exibiram um aumento acentuado de intensidade da banda mais larga entre 3698 e 2448 cm^{-1} e também da banda em torno de 1626 cm^{-1} .

Os espectros detalhados, na região entre $1800 - 430\text{ cm}^{-1}$, das nHAs substituídas e co-substituídas estão representados nas Figuras 17 e 18. Pode ser visto que nas HAs substituídas, a banda de absorção em 630 cm^{-1} (correspondente ao modo de vibração dos íons OH^-) apresenta um pequeno deslocamento para menores números de onda, sendo que o pico diminui de

intensidade e torna-se mais alargado. Além disso, ocorre um alargamento de três bandas atribuídas aos grupos fosfatos (PO_4^{-3}) que aparecem em torno de 1096 cm^{-1} , 1034 cm^{-1} e 960 cm^{-1} .

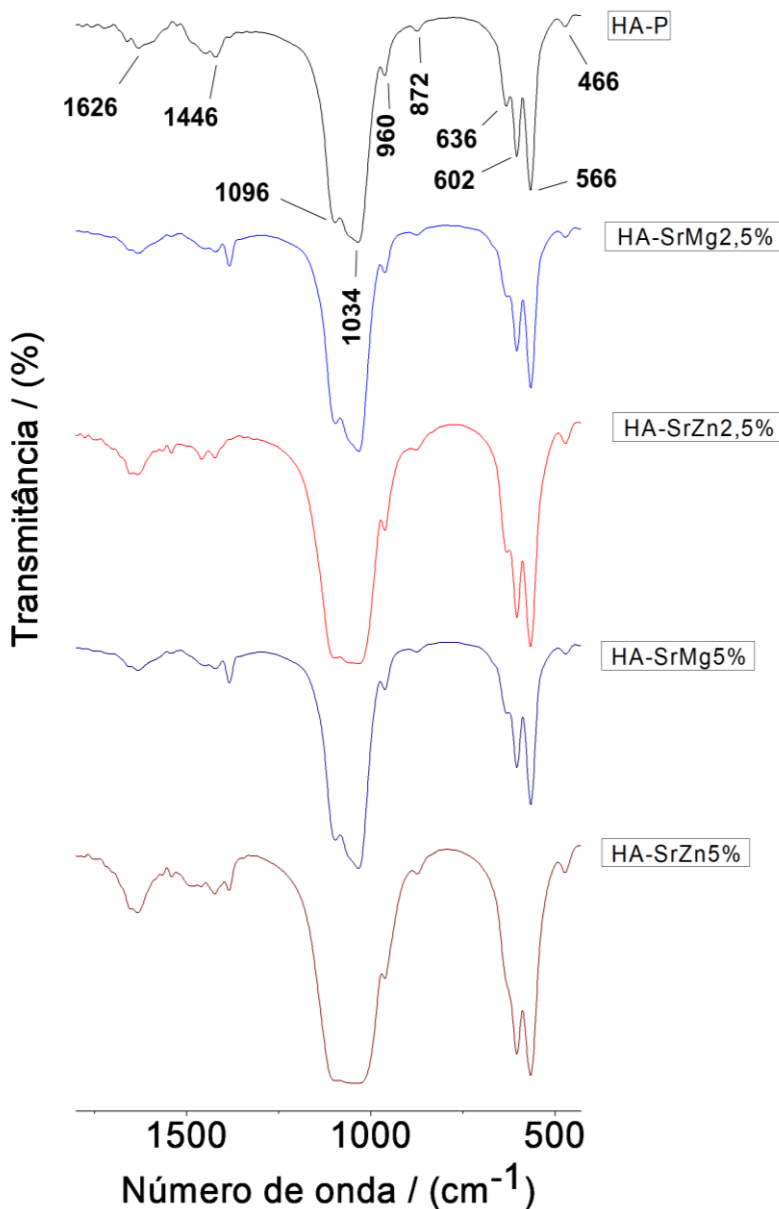
Nas HAs co-substituídas, a banda de absorção em 630 cm^{-1} apresenta as mesmas alterações descritas para as nHAs substituídas. Por outro lado, o alargamento das bandas dos grupos fosfatos (PO_4^{-3}) ocorre somente nas nHAs co-substituídas com Sr^{2+} e Zn^{2+} e apenas no modo de estiramento assimétrico, em torno de 1096 cm^{-1} e 1034 cm^{-1} .

Figura 17. Espectros FITR detalhados, em 1800-430, das nHAs pura e substituídas com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} .



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 18. Espectros FTIR detalhados, em 1800-430, das nHAs pura e co-substituídas com Mg^{2+}/Sr^{2+} e Zn^{2+}/Sr^{2+} .



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

As mudanças observadas nos espectros de FT-IR são decorrentes das modificações provocadas pelo Sr^{2+} no ambiente químico dos grupos funcionais apatíticos, PO_4^{3-} e OH^- . A redução de intensidade dos picos correspondentes ao grupo OH^- está relacionada com a relação entre os eixos a e c da unidade cristalina da HA. É importante ressaltar que os grupos hidroxila estão

localizados ao longo do eixo c, dentro de canais constituídos por três cátions do tipo M (2), que formam triângulos planares, perpendiculares às ligações OH⁻. A presença simultânea dos íons Sr²⁺ e Ca²⁺ nas posições M (2) geram uma forte perturbação na rede cristalina em termos de raio iônico e eletronegatividade. Além disso, o alongamento anisotrópico das células cristalinas ao longo do eixo c implica na diminuição da densidade espacial das ligações OH⁻. Estas condições provavelmente afetam o modo de vibração da hidroxila causando a redução do sinal de absorção FT-IR correspondente. Por outro lado, a diminuição da frequência vibracional do grupo PO₄⁻³ pode ser atribuída à redução da energia entre algumas ligações fósforo-oxigênio, resultante do aumento da distância entre os grupos PO₄⁻³ como consequência da expansão da rede cristalina da HA (FRASNELLI *et al.*, 2017).

As alterações observadas nos espectros das nHAs, substituídas e co-substituídas, se tornaram mais nítidas nas dopagens com 10% em mol de substituição. Os espectros obtidos estão em acordo com os difratogramas, pois também sugerem que ocorreu uma desorganização dos cristais das nHAs substituídas e co-substituídas. Outros trabalhos também relataram que a substituição da HA modificou o modo de vibração dos grupos funcionais (PO₄⁻³) e dos íons OH⁻, após a incorporação de Sr²⁺ (AL-WAFI *et al.*, 2017; BIGI *et al.*, 2007), Mg²⁺ (CACCIOTTI *et al.*, 2009) e Zn²⁺ (BEGAM *et al.*, 2017).

6.1.5 Análise térmica

As curvas Tg demonstram que as nHAs sintetizadas sofreram uma perda de massa constante entre 25-600 °C (Figuras 19 e 20). Os percentuais de perda total de massa das amostras estão apresentados na Tabela 7.

Os diferentes percentuais de perda de massa das HAs parecem estar relacionados à quantidade de moléculas de água adsorvidas e que compõe a estrutura intracristalina das amostras sintetizadas. Os maiores percentuais de perda de massa ocorreram nas HAs substituídas com Zn²⁺, sendo maior para HA-Zn10% (8,89%). Esses resultados estão em acordo com os espectros de FTIR das HAs substituídas com Zn²⁺, que indicaram que essas amostras apresentaram maior percentual de água adsorvida.

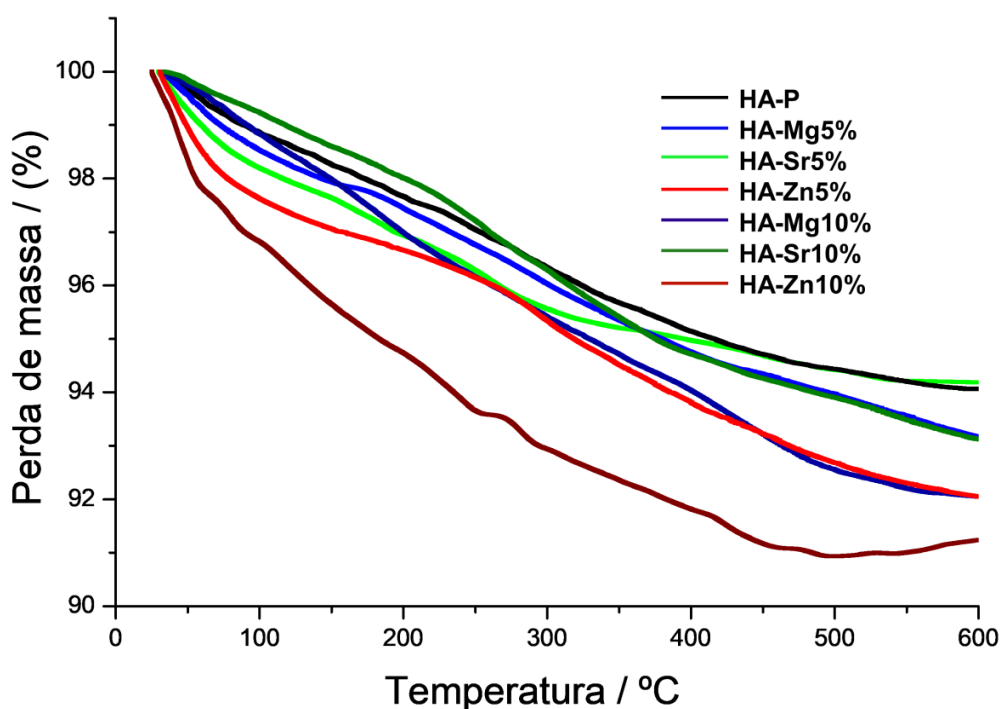
Tabela 7. Percentuais de perda de massa total das nHAs em 600 °C.

Amostra:	Perda de massa (%)
HA-P	5,7
HA-Mg5%	6,5
HA-Sr5%	5,6
HA-Zn5%	7,8
HA-Mg10%	7,8
HA-Sr10%	6,4
HA-Zn10%	8,8
HA-SrMg2,5%	6,8
HA-SrZn2,5%	6,9
HA-SrMg5%	7,9
HA-SrZn5%	7,9

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

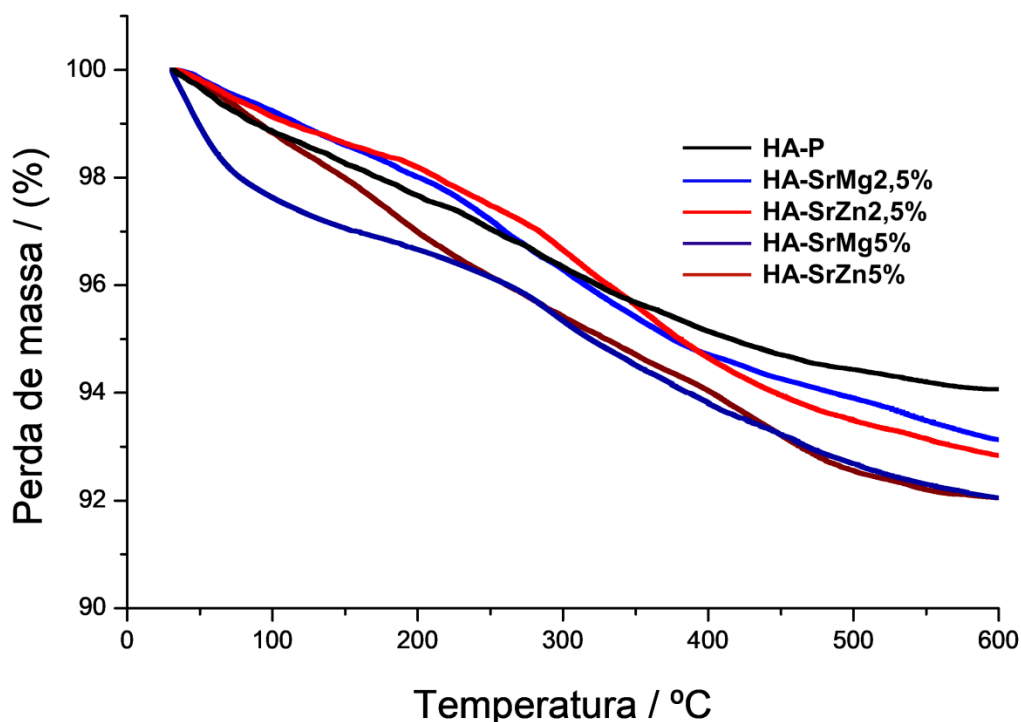
As moléculas de água e o CO₂ fisicamente adsorvidos na superfície foram liberados a temperaturas entre 25 a 200°C. Na faixa de 200 a 600 °C, a perda de massa pode estar relacionada à perda de água intracristalina e à redução dos grupos OH⁻, como foi relatado para outras HAs pura e substituídas (GUERRA-LÓPEZ et al., 2015; STIPNIECE et al., 2014).

Figura 19. Curvas TG das Hidroxiapatitas pura e substituídas com Mg²⁺, Sr²⁺ e Zn²⁺.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 20. Curvas TG das Hidroxiapatitas pura e duplamente substituídas com Mg^{2+}/Sr^{2+} e Zn^{2+}/Sr^{2+} .



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

6.1.6 Potencial Zeta

Para suspensões de partículas na água, o potencial zeta é a diferença de potencial elétrico entre o meio de dispersão e a camada estacionária de fluido aderida à partícula dispersa. A carga de 25 mV (positiva ou negativa) é o valor que separa as superfícies com baixa carga das superfícies de alta carga. O potencial zeta está relacionado à estabilidade das dispersões de partículas, indicando o grau de repulsão entre partículas com carga semelhante. Altos valores de potencial zeta (negativo ou positivo) conferem as partículas estabilidade e resistência à agregação. Quando o potencial zeta é baixo, a atração excede a repulsão e as partículas tendem a se agregar (DOOSTMOHAMMADI *et al.*, 2012).

Assim, a carga superficial é um dos fatores que afetam a adsorção de proteínas, sendo que as interações das proteínas com a estrutura da HA dependem do tipo e da ionização da própria proteína. Por exemplo, muitas

proteínas (como fibrinogênio, fibronectina e albumina sérica) são carregadas negativamente em pH fisiológico, portanto sua adsorção em superfícies com carga negativa pode ser afetada (SKWAREK, JANUSZ e STERNIK, 2017). No entanto, podem ocorrer dois tipos de interações entre as proteínas e a HA: os íons cálcio da HA, com carga positiva, podem interagir com os grupos carboxílicos negativos das proteínas; ou os grupos fosfatos negativos da HA podem formar ligações com os grupos amina positivos das proteínas (KOUTSOPOULOS e DALAS, 2000; ZHOU *et al.*, 2007).

Os valores de potencial zeta das nHAs sintetizadas variaram de 0,2 mV a -9,9 mV, em meio neutro (pH = 7). As amostras de HA-P e HA-Zn10% apresentaram as maiores cargas superficiais. Todas as partículas apresentaram baixa carga de superfície, sendo instáveis e com forte tendência a se aglomerar. Houve um predomínio de nHAs com carga negativa (tabela 8), o que está em acordo com os valores de potencial zeta de cerâmicas sintéticas descrita na literatura (LOPES *et al.*, 1999; RIBEIRO, SOUZA e MONTEIRO, 2010). Além disso, outros estudos relataram que HAs substituídas apresentam carga superficial negativa (FAHAMI, BEALL e BETANCOUR, 2016; FUJII *et al.*, 2006). De fato, com exceção das amostras de HA-Mg10% e HA-MgSr5% que exibiram valores de potencial zeta próximos a zero, a carga de superfície de todas as outras amostras de HA mimetizam a carga de superfície da HA presente no osso, que também é negativa em pH neutro (DOOSTMOHAMMADI *et al.*, 2012).

Somado a isso, têm sido sugerido que valores negativos de potencial zeta podem ser favoráveis à fixação e proliferação de células ósseas (DOOSTMOHAMMADI *et al.*, 2012; FAHAMI, BEALL e BETANCOUR, 2016). Pois, como o colágeno e a HA óssea (principais fases orgânicas e inorgânicas do osso natural) apresentam cargas negativas, os FC com carga superficial negativa também poderiam regular as respostas osteogênicas dos osteoblastos e promover a bioatividade desses biomateriais (SURMENEV, SURMENEVA e IVANOVA, 2014). A hipótese mais aceita é que o potencial zeta negativo favorece a adsorção de íons Ca^{2+} , os quais participam da deposição da matriz extracelular e conseqüentemente da fixação celular, uma vez que as células se

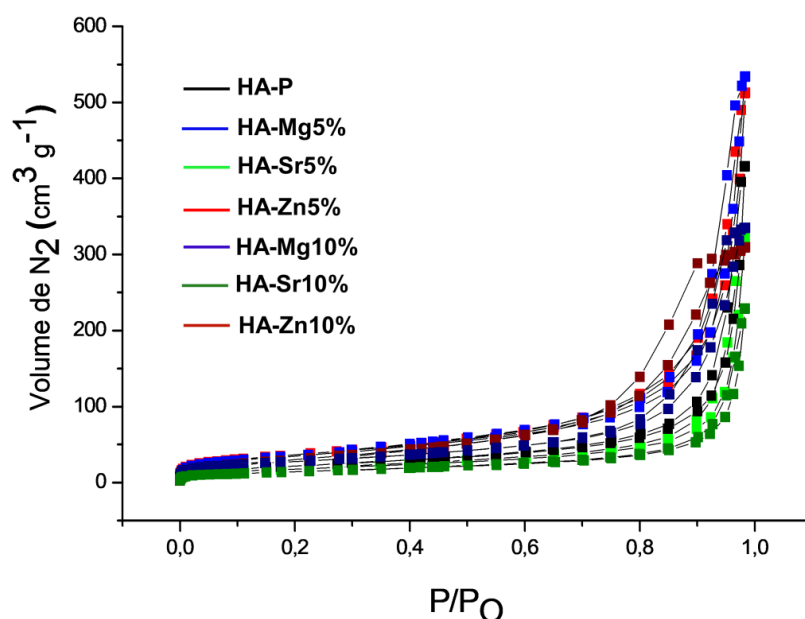
ligam a matriz extracelular adsorvida à superfície do biomaterial (CHENG *et al.*, 2005).

6.1.7 Determinação da área de superfície e tamanho de poro

As áreas de superfície específica e a distribuição de tamanho de poros das amostras de nHAs foram obtidas pelos métodos BET (Brunauer, Emmett e Teller) e BJH (Barrett, Joyner e Halenda), respectivamente, adotando uma faixa linear de p / p_0 para estimativa de área específica (C constante positivo) (TAN *et al.*, 2012).

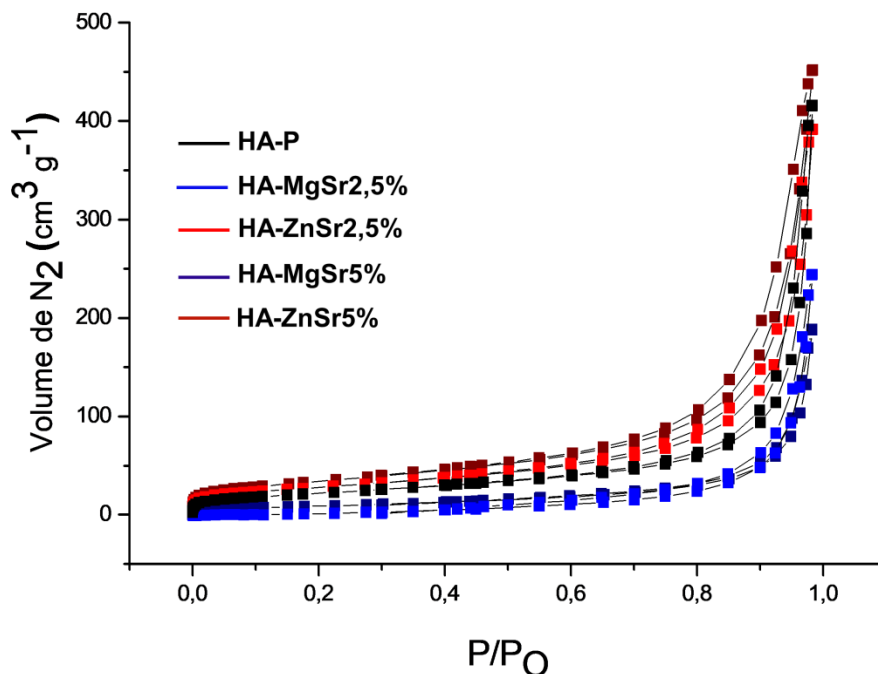
As isotermas de adsorção-dessorção de N_2 , das nHAs sintetizadas, estão apresentadas nas Figuras 21 e 22. De acordo a classificação IUPAC, as HAs exibem o padrão de isotermas do tipo II, onde a adsorção ocorre em multicamadas com altos valores de (P/P_0) apresentando um loop de histerese do tipo H3 e sem platô em altas pressões. Esse perfil é característico da formação de agregados de partículas e/ou materiais meso e macroporosos (THOMMES *et al.*, 2015) Assim, as HAs sintetizadas podem ser classificadas como um material predominantemente macroporoso.

Figura 21. Isotermas de adsorção-dessorção das HAs pura e substituídas por Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} .



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 22. Isotermas de adsorção-dessorção das HAs pura e co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} e Zn^{2+}/Sr^{2+} .



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A literatura relata que a área superficial específica da HA estequiométrica e do mineral ósseo natural corresponde a $35,8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e $87,4 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente (MISRA, BOWEN e MATTAMAL, 1978). No presente estudo, as nHAs sintetizadas por precipitação aquosa exibiram área superficial específica variando entre $50 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e $131 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (Tabela 8). Todas as nHAs apresentaram área superficial próxima ou superior a dos minerais ósseos naturais, com exceção a HA-SrMg5% que foi similar a HA estequiométrica.

Os resultados revelam que as nHAs contendo Sr exibiram as menores áreas superficiais específicas, sendo que a nHA-MgSr5% apresentou uma redução significativa quando comparado a HA-P e às demais amostras. As nHAs substituídas por Mg exibiram os maiores valores de áreas superficiais específicas, quando comparada a HA-P. No entanto, as nHAs co-substituídas por Mg^{+2}/Sr^{+2} apresentaram baixos valores de área superficial, sugerindo que o Sr teve maior influência sobre essa propriedade que o Mg. Estes resultados podem ser explicados pela baixa incorporação de Mg e alta incorporação de Sr

na rede cristalina das nHAs co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} . Outros estudos demonstraram que em HAs co-substituídas contendo Mg^{2+}/Sr^{2+} a presença de Mg^{2+} resultou no aumento da área superficial específica, sendo que o Sr^{2+} foi responsável pela sua redução (AINA *et al.*, 2012; GARBO *et al.*, 2020).

Por outro lado, as nHAs substituídas por Zn^{2+} apresentaram maiores valores de área superficial que a HA-P, sendo que a HA-Zn5% exibiu a maior área superficial específica de todas as nHAs. De forma similar, Anwar *et al.* (2016) relataram que as HAs substituídas por Zn^{2+} apresentaram maior área de superfície que a HA pura. Além disso, as nHAs co-substituídas por Sr^{2+}/Zn^{2+} exibiram maiores valores de área superficial que as nHAs substituídas por Sr^{2+} e que as nHAs co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} , indicando que o Zn teve influência predominante sobre a área superficial.

É importante notar que os altos valores de área superficial encontrados parecem estar relacionados ao tamanho das partículas de nHAs (Tabela 8). A literatura relata que as nanopartículas possuem maior área superficial específica que às micropartículas (LOWE, HARDY e WALSH, 2020) e que as substituições iônicas podem aumentar a área superficial das HAs (PADILLA, IZQUIERDO-BARBA e VALLET-REGÍ, 2008). De fato, as nHAs substituídas e co-substituídas contendo Zn exibiram os menor tamanhos de partícula e os maiores valores de área superficial.

É amplamente aceito que a capacidade de adsorção de proteínas depende da área superficial específica, da densidade da carga superficial e da distribuição de tamanho dos poros das partículas (FUJII *et al.*, 2006). De fato, a área superficial específica e a capacidade de adsorção de proteínas aumentam fortemente à medida que o tamanho das nanopartículas diminui (SZALAJ *et al.*, 2019). Assim, as HAs que possuem maiores áreas de superfície e reduzido tamanho de partícula podem favorecer a adsorção de proteínas ósseas (MORALEDA, SAN ROMAN e RODRIGUEZ-LORENZO, 2013). Portanto, as nHAs sintetizadas neste trabalho possuem grande potencial para aplicações biológicas, pois exibem uma combinação de características semelhantes à apatita óssea que incluem: reduzidas dimensões, baixa cristalinidade, elevada área superficial específica, carga superficial negativa, composição não estequiométrica e presença de diferentes íons na rede cristalina.

Tabela 8. Valores de área superficial específica, diâmetro do poro, potencial zeta (em pH 7), comprimento de partícula e forma das partículas de nHAs.

Amostra:	Morfologia da partícula	Comprimento da partícula (nm)	Potencial zeta (mV) - pH 7.0	Área de Superfície area (m ² /g)	Média do diâmetro do poro (nm)
HA-P	bastonete	35,9 ± 9,7	- 7,3 ± 0,6	78	32,9
HA-Mg5%	bastonete	24,7 ± 6,5	-1,6 ± 0,3	126	24,1
HA-Sr5%	bastonete	26,4 ± 8,0	- 0,8 ± 0,05	63	31,3
HA-Zn5%	bastonete	19,2 ± 5,0	- 2,0 ± 0,2	131	24,1
HA-Mg10%	bastonete	29 ± 11	0,2 ± 0,7	98	21,0
HA-Sr10%	bastonete	33,5 ± 14	- 4,0 ± 0,4	50	27,8
HA-Zn10%	bastonete	17,3 ± 4,3	- 9,9 ± 0,2	109	17,5
HA-SrMg2,5%	bastonete	35 ± 13	- 3,0 ± 0,6	66	35,6
HA-SrZn2,5%	bastonete + esférica	22,7 ± 4,7	- 2,2 ± 0,01	99	24,3
HA-SrMg5%	bastonete	33,8 ± 11	0,1 ± 0,08	31	37,0
HA-SrZn5%	bastonete + esférica	19,7 ± 4,4	- 1,3 ± 0,2	121	23,0

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

6.2 Teste de citotoxicidade das nano-hidroxiapatitas

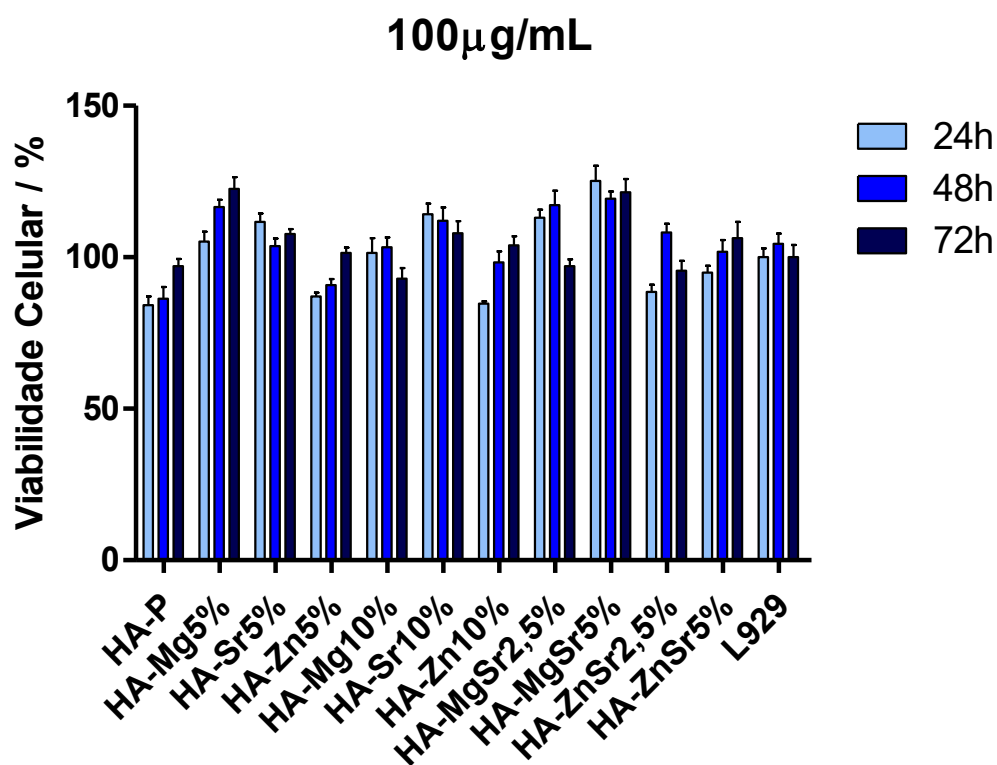
O teste de MTT foi realizado em cultura de células fibroblásticas L929 e pré-osteoblásticas MC3T3 em contato direto com as nHAs sintetizadas. O modelo de células fibroblásticas foi usado porque essas são as principais células envolvidas nos processos de reparo tecidual e cicatrização de feridas. Por outro lado, a citotoxicidade foi testada em cultura de células osteoblásticas para avaliar o possível potencial das nHAs em induzir a proliferação de células ósseas.

Os resultados dos testes de MTT revelaram que após 24, 48 e 72 horas as nHAs sintetizadas não apresentaram citotoxicidade para as culturas de células L929 e MC3T3. Além disso, o crescimento celular dos grupos controle foi semelhante em todos os testes, após 24, 48 e 72 horas de incubação.

O ensaio de MTT realizado em cultura de células L929, em contato direto com suspensões de nHA na concentração de 100µg/mL, demonstrou que a viabilidade celular do grupo HA-Mg5% foi significativamente maior que a

do grupo controle, após 48 e 72 horas. O percentual de células viáveis do grupo HA-MgSr5% foi significativamente maior que o do grupo controle, após 24, 48 e 72 horas ($p < 0,001$). O percentual de viabilidade celular mais expressivo foi do grupo HA-MgSr5%, seguido pelo grupo HA-Mg5%. O crescimento celular do grupo HA-MgSr5% foi maior que o do grupo HA-Mg5% após 24 horas ($P < 0.001$) e maior que em todos os outros grupos em estudo (após 24, 48 e 72 horas). As diferenças foram estatisticamente significativas para vários tempos de estudo (Figura 23). Por outro lado, após 48 e 72 horas o percentual de células viáveis do grupo HA-Mg5% foi maior que os dos grupos HA-P e das HAs substituídas por Mg^{2+} (10%), Sr^{2+} (5% e 10%) ou Zn^{2+} (5% e 10%). Além disso, após 72 horas a viabilidade celular do grupo HA-Mg5% foi maior que de todos os grupos em estudo ($P < 0.001$), somente para o grupo HAMgSr5% as diferenças não foram significativas (Figura 24).

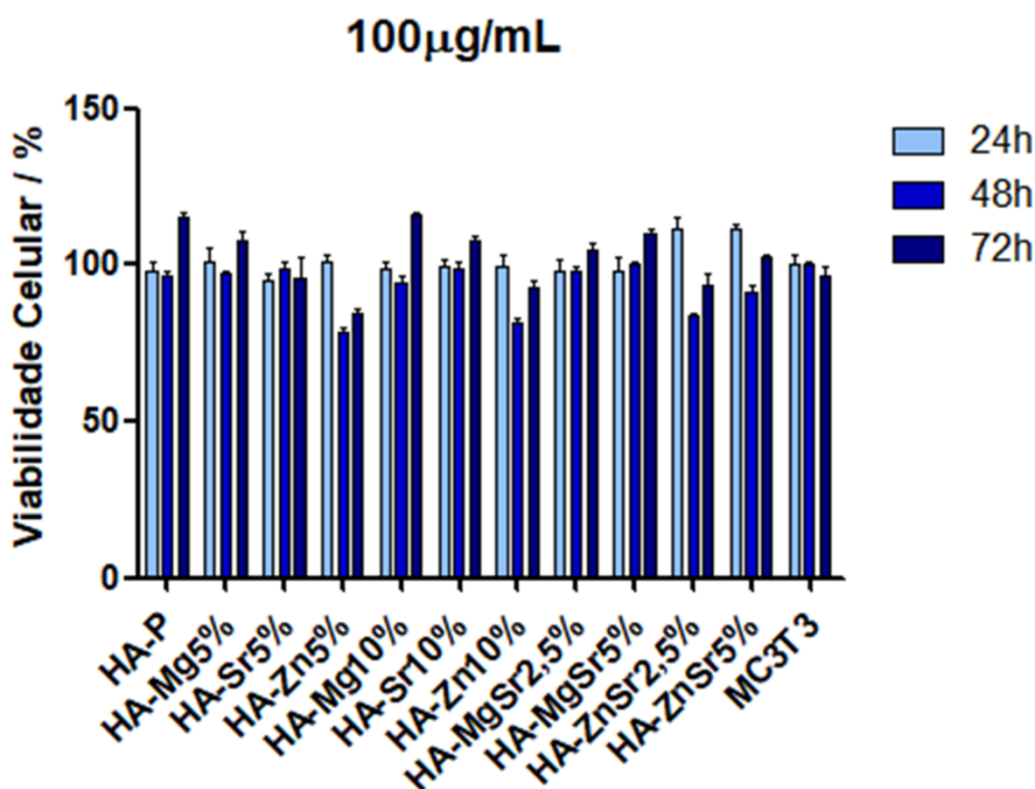
Figura 23. Citotoxicidade dos grupos de nHA (100 μ g/mL) em contato direto com fibroblastos L929, após 24, 48 e 72 horas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O teste de MTT em culturas de células MC3T3, em contato direto com suspensões de nHA na concentração de 100 µg/mL, demonstrou que a HA-P, HA-Mg5%, HA-Mg10% e HA-MgSr5% exibiram crescimento celular significativamente maior que o grupo controle, após 72 horas ($P < 0.001$). Os maiores percentuais de crescimento celular foram exibidos pelos grupos HA-MgSr5%, HA-ZnSr2,5% e HA-ZnSr5%. Após 24 horas, os percentuais de células viáveis presente nos grupos HA-ZnSr2,5% e HA-ZnSr5% foram significativamente maior que de todos os grupos em estudo. Por outro lado, após 72 h o grupo HA-MgSr5% apresentou melhor viabilidade que os outros grupos, com exceção da HA-P e HA-Mg10%. Essas diferenças foram estatisticamente significativas para vários grupos e pode ser vista na Figura 24.

Figura 24. Citotoxicidade dos grupos de nHA (100µg/mL) em contato direto com as células pré-osteoblásticas MC3T3, após 24, 48 e 72 horas.

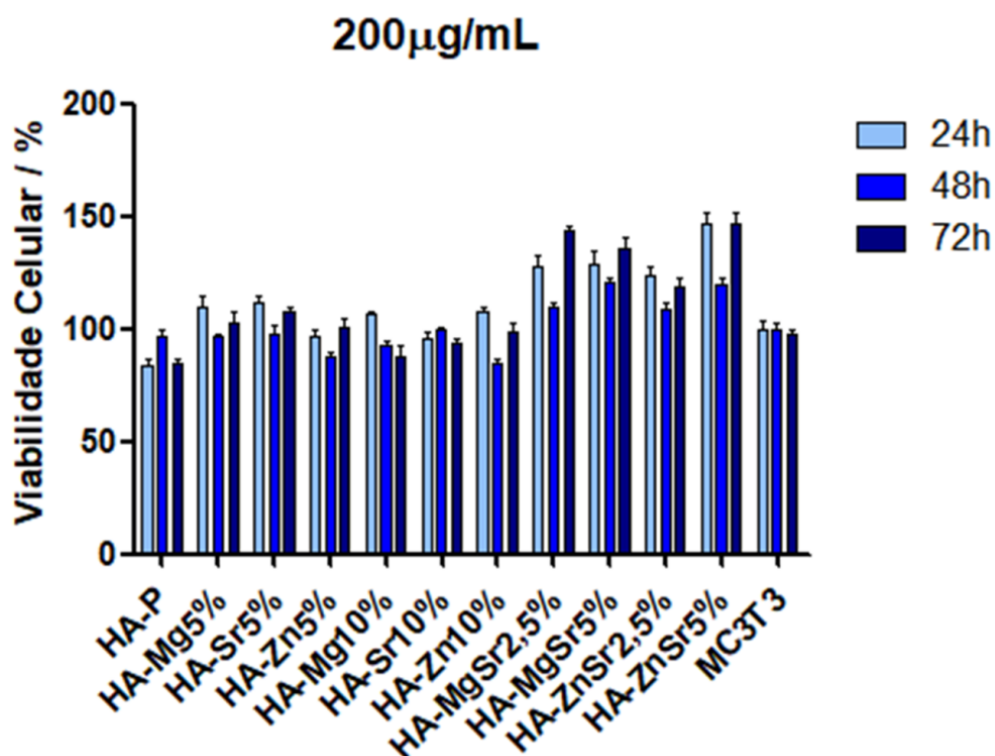


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O teste de MTT em culturas de células MC3T3, em contato direto com suspensões de nHA na concentração de 200 µg/mL, revelou que a viabilidade

celular dos grupos das HAs co-substituídas foram muito expressivas. Os grupos HA-MgSr2,5%, HA-MgSr5%, HA-ZnSr2,5% e HA-ZnSr5% apresentaram maiores percentuais de células viáveis que todos os outros grupos em estudo, após 24, 48 e 72 horas. Essas diferenças foram estatisticamente significativas para vários grupos e pode ser vista na Figura 25. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos HA-MgSr2,5% e HA-MgSr5%. Por outro lado, os percentuais de células viáveis dos grupos HA-MgSr2,5% e HA-MgSr5% foram significativamente maiores que o do grupo HA-ZnSr2,5%, após 72 horas ($P < 0.001$). A viabilidade celular do grupo HA-ZnSr5% foi significativamente maior que a grupo HA-ZnSr2,5%, após 24 e 72 horas ($P < 0.001$). Além disso, após 24 horas o crescimento celular do grupo HA-ZnSr5% foi significativamente maior que o dos grupos HA-MgSr2,5% e HA-MgSr5% ($P < 0.001$). Porém, não houve diferenças significativas entre eles, após 48 e 72 horas.

Figura 25. Citotoxicidade dos grupos de nHA (200 μ g/mL) em contato direto com as células pré-osteoblásticas MC3T3, após 24, 48 e 72 horas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Estudos anteriores demonstraram a biocompatibilidade de HAs substituídas com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} em estudos de viabilidade em cultura de células osteoblásticas e fibroblásticas (HAO *et al.*, 2012; COX *et al.*, 2014; FRASNELLI *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2018). Além disso, outros autores avaliaram a biocompatibilidade de HAs co-substituídas. Kulanthaivel *et al.* (2015) verificaram que as HAs co-substituídas por Mg^{2+}/Zn^{2+} exibiram maiores percentuais de proliferação de células ósseas MG-63 que a HA pura e o controle. Somado a isso, Xiao *et al.*, 2018 relataram que a viabilidade de células L929, mantidas em contato direto com soluções de HA-P, HA substituída com Zn^{2+} , HA co-substituída por Zn^{2+}/Sr^{2+} e por $Zn^{2+}/Sr^{2+}/F^-$, aumentou a medida que o número de elementos dopantes aumentava, demonstrando que a HA com dopagem tripla teve melhor desempenho quando comparada aos outros grupos.

Em concordância com a literatura, os resultados deste estudo demonstram que as soluções de nHAs exibiram excelente biocompatibilidade e podem promover a proliferação de fibroblastos e osteoblastos. Além disso, a viabilidade celular pode variar de acordo com a concentração de nHAs em contato com as células, pois maiores concentrações de HAs resultaram em maiores percentuais de crescimento celular. Somado a isso, os resultados obtidos sugerem que as nHAs co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} ou Zn^{2+}/Sr^{2+} parecem induzir um maior crescimento de células fibroblásticas e osteoblásticas, quando comparado as nHAs substituídas com Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} . Além disso, as nHAs com maior percentual de co-substituição parecem induzir maiores índices de proliferação celular.

Apesar de haver muitos trabalhos que sintetizaram nHAs substituídas com Mg, Zn e Sr, até o momento parece não haver estudos que fizeram uma comparação das propriedades físico-químicas e do comportamento biológico, entre um número mais amplo de nHAs substituídas e co-substituídas por Mg, Sr e Zn. Assim, esses resultados podem contribuir para o entendimento das características das HAs substituídas e também para a obtenção de HAs que apresentem um melhor desempenho como biomaterial.

Com base nos resultados de viabilidade celular e considerando que as nHAs co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} ou Zn^{2+}/Sr^{2+} podem fornecer para o

ambiente dois íons envolvidos no metabolismo ósseo, essas nHAs foram escolhidas para serem utilizadas como principal componente dos cimentos ósseos desenvolvidos. Além disso, a HA-P foi utilizada para avaliação e comparação entre os grupos.

6.3 Caracterização físico-química dos cimentos ósseos

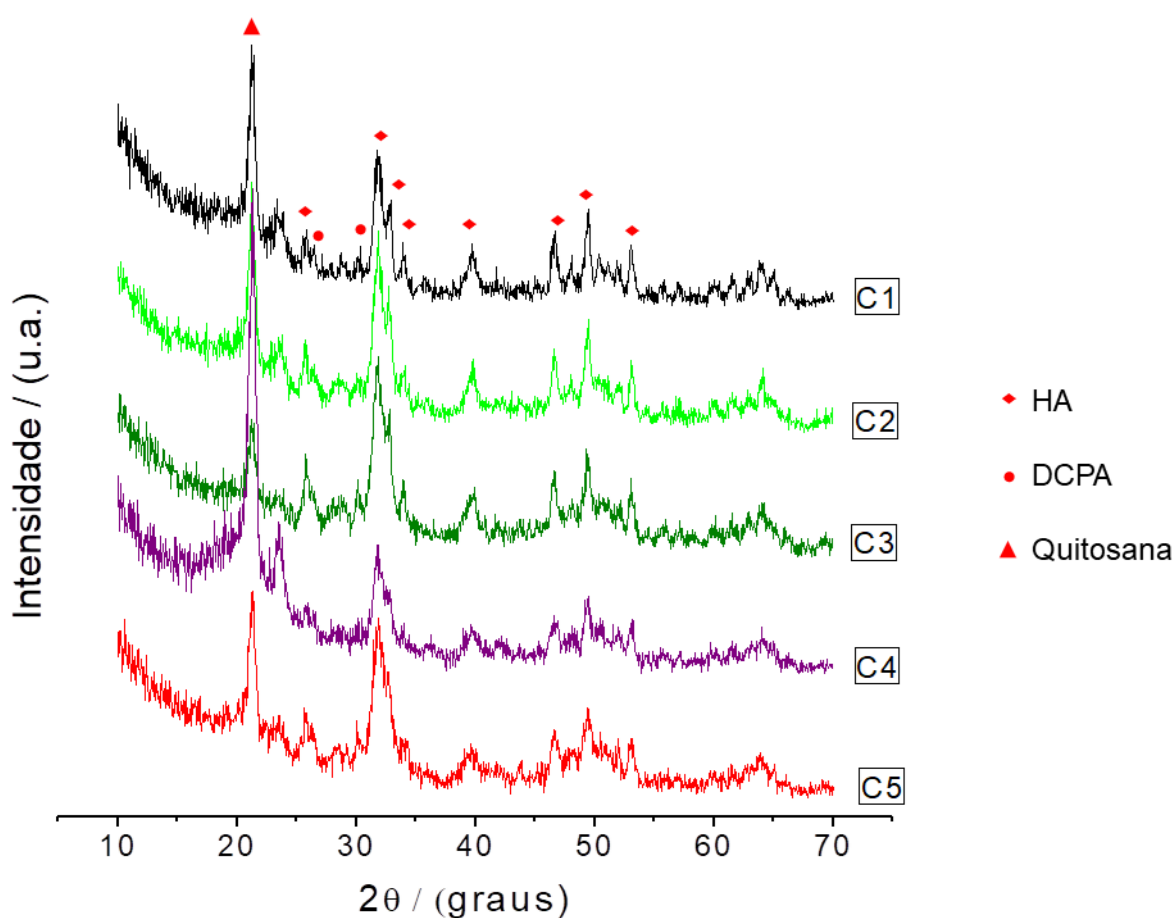
6.3.1 Difração de raios-X

A difração de raios-X, pelo método de pó, foi utilizada para avaliar a composição e estrutura dos cimentos ósseos desenvolvidos. Nas Figuras 26 e 27 estão representados respectivamente: os difratogramas dos cimentos ósseos e os difratogramas dos principais componentes, das fases líquida e pó, dos cimentos. Os difratogramas dos cimentos desenvolvidos exibem o predomínio de picos característicos da HA, o que está em acordo com o alto percentual de HA presente na composição dos cimentos. Podem ser observados os seguintes picos de difração em valores de 2θ e planos hkl correspondentes: $25,68^\circ$ (002), $28,85^\circ$ (210), $31,80^\circ$ (211), $32,81^\circ$ (112), $33,85^\circ$ (300), $39,77^\circ$ (310), $46,71^\circ$ (222) e $49,40^\circ$ (213). Os picos de difração descritos acima, se apresentaram alargados e com baixa intensidade, indicando que durante o endurecimento dos cimentos pode ter formado HADC que possui baixa cristalinidade. Além disso, a redução da intensidade dos picos de difração pode estar relacionada à presença de quitosana, que cria distorções na estrutura cristalina da HA (Danilchenko *et al.*, 2010).

Adicionalmente, foram observados dois picos de baixa intensidade em valores de 2θ em: $26,45^\circ$ e $30,15^\circ$; que são característicos do DCPA (MIYAZAKI *et al.*, 2009). Além disso, a presença da quitosana nos cimentos ósseos é indicada por um pico de alta intensidade em valor de 2θ e plano hkl correspondente em: $21,40^\circ$ (120), que correspondente ao estado amorfo da quitosana (SAYYAR *et al.*, 2015). Os picos de difração característicos da gelatina não foram visualizados nos difratogramas (RAMIREZ-AGUDELO *et al.*,

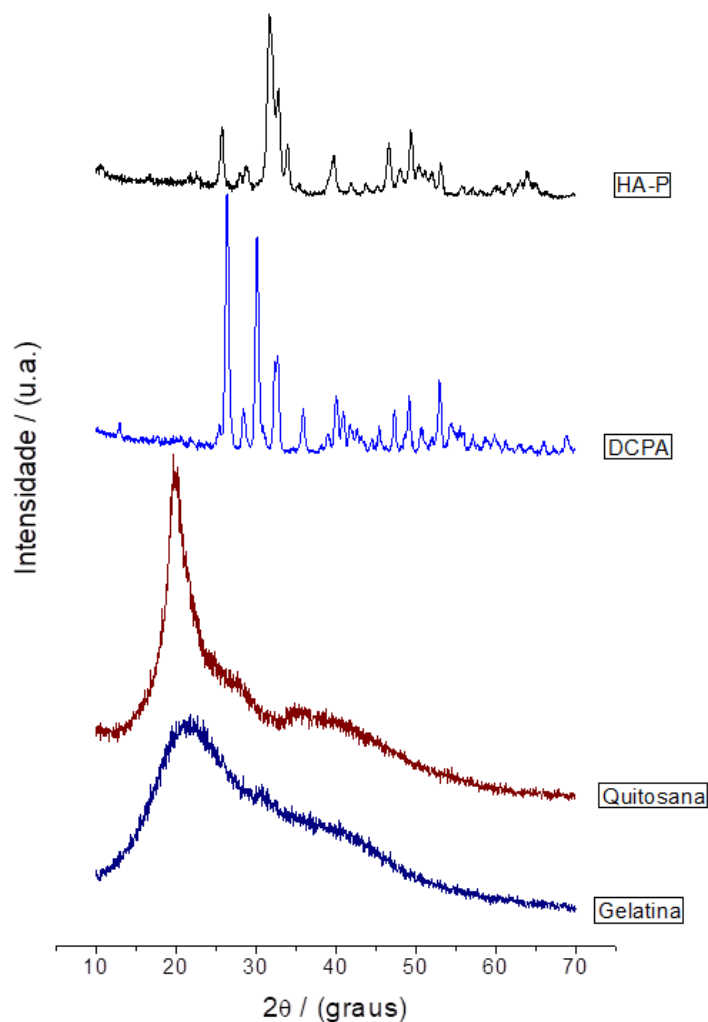
2018). Esse resultado pode ser explicado por duas condições: a) devido ao baixo percentual de gelatina presente no líquido dos cimentos, o equipamento não é sensível o suficiente para detectar esse polímero e/ou b) pode ter ocorrido uma sobreposição do pico de difração dos outros componentes sobre os picos de difração da gelatina.

Figura 26. Difratoogramas de raios-x dos Cimentos à base de HA e picos de difração correspondentes a hidroxiapatita, fosfato de cálcio dibásico anidro e quitosana.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 27. Difratoogramas de raios-x dos principais componentes dos cimentos ósseos: hidroxiapatita pura (HA-P), fosfato de cálcio bibásico anidro (DCPA), quitosana e gelatina.



Fonte: Dados de pesquisa, 2020.

6.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

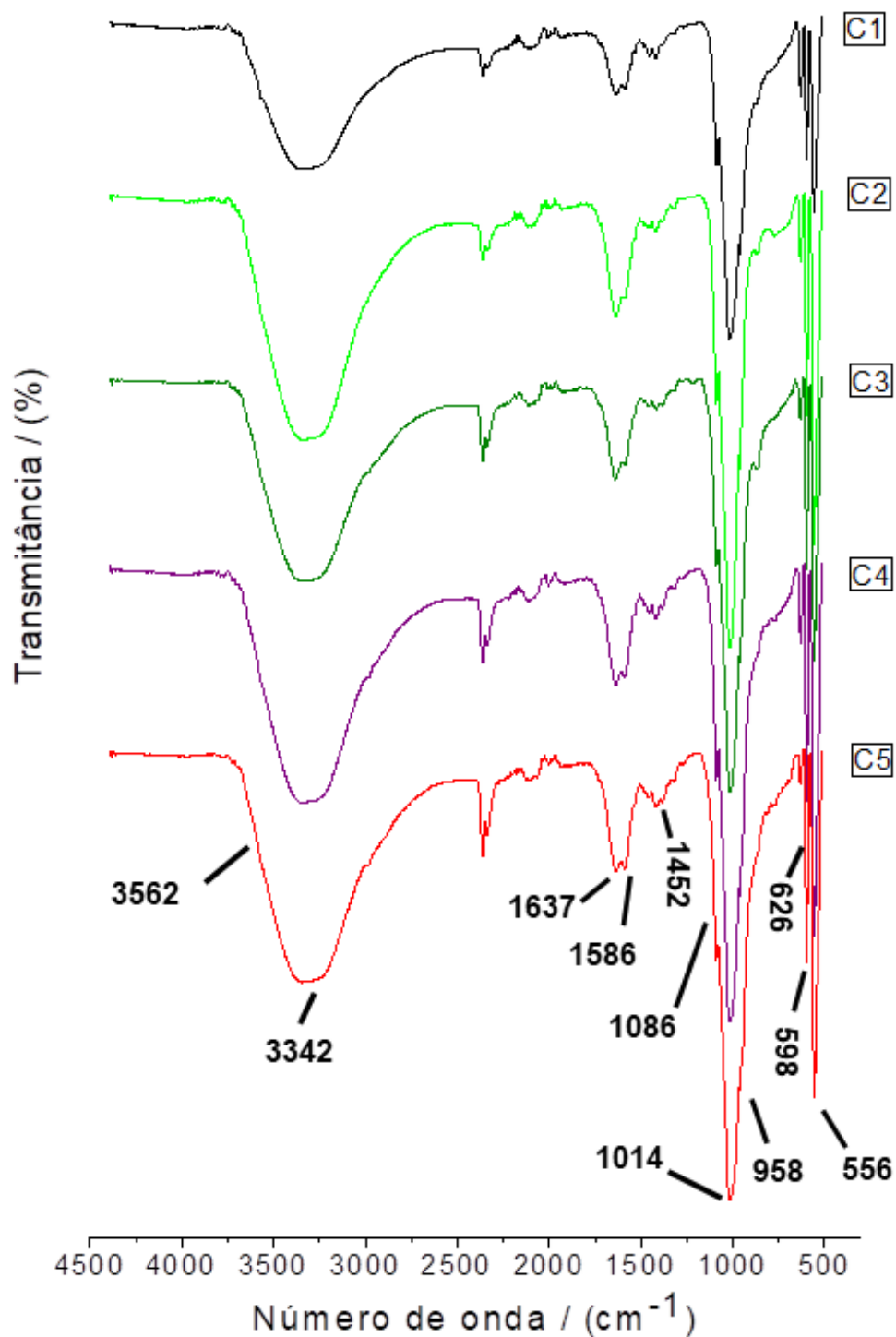
A FT-IR foi realizada para investigar os grupos funcionais das amostras dos cimentos à base de HA. Os espectros dos cimentos ósseos e dos seus principais componentes, das fases líquida e pó, estão respectivamente representados nas Figuras 28 e 29. Os espectros FT-IR dos cimentos exibiram

uma banda mais larga entre 3702 e 2914 cm^{-1} com pico intenso em 3342 cm^{-1} , que pode ser relativa à água adsorvida durante a reação de presa do cimento. As bandas em 1452 cm^{-1} e em 872 cm^{-1} são atribuídas à presença de CO_3^{2-} . Além disso, há um predomínio de bandas de absorção características da HA. A banda em 3562 cm^{-1} é relativa ao modo de estiramento simétrico do grupo OH^- , presente na HA. As bandas intensas que aparecem em 1086 cm^{-1} e 1014 cm^{-1} (estiramento assimétrico do grupo PO_4^{3-}) e a banda em 626 cm^{-1} (modo vibracional dos íons OH^-), também são exclusivas da HA.

No entanto, as bandas de absorção presentes em 958 cm^{-1} (estiramento simétrico do grupo PO_4^{3-}), em 598 cm^{-1} e 556 cm^{-1} (deformação assimétrica do grupo PO_4^{3-}) são características tanto da HA como do DCPA (AL-WAFI *et al.*, 2017; SINGH, DASGUPTA e BHASKAR, 2019). Essas bandas apresentaram maior intensidade e um ligeiro deslocamento para menores números de onda, quando comparado ao espectro da HA pura. Essas alterações indicam que há uma sobreposição das bandas da HA sobre as bandas de absorção do DCPA.

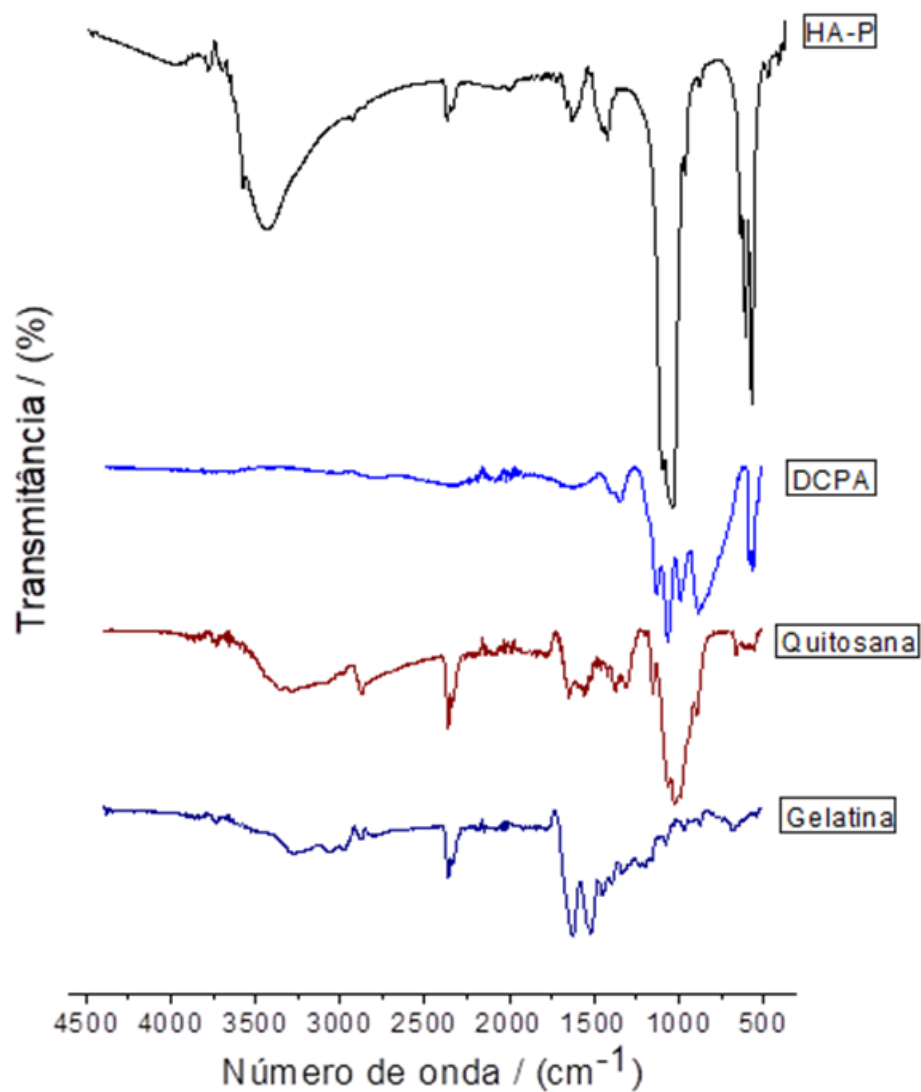
A presença da quitosana é indicada pela banda de absorção em 1637 cm^{-1} , que é referente ao modo de estiramento do $\text{C}=\text{O}$ (do grupo amida I, da quitina residual presente na estrutura da quitosana). Além disso, aparece a banda de absorção em 1586 cm^{-1} referente ao modo de deformação N-H do grupo amina, que é característico da quitosana (SAYYAR *et al.*, 2015). Em geral, a banda de absorção do grupo amida I ocorre em 1651 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ estiramento), o pequeno desvio desta banda para 1638 cm^{-1} indica a presença de ligações de hidrogênio entre a carbonila, do grupo amida da quitosana, com grupos hidroxila da HA (SUKHODUB, SUKHODUB e CHORNA, 2016). Por outro lado, os espectros dos cimentos não exibiram bandas de absorção típicas da gelatina e do β -glicerofosfato, o que pode ser explicado pelo baixo percentual destes compostos e/ou por terem sido sobrepostos pelas bandas de absorção dos outros componentes dos cimentos.

Figura 28. Espectros FI-TR dos cimentos à base de HA.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 29. Espectros FI-TR dos principais componentes dos cimentos ósseos: hidroxiapatita pura (HA-P), fosfato de cálcio bibásico anidro (DCPA), quitosana e gelatina.

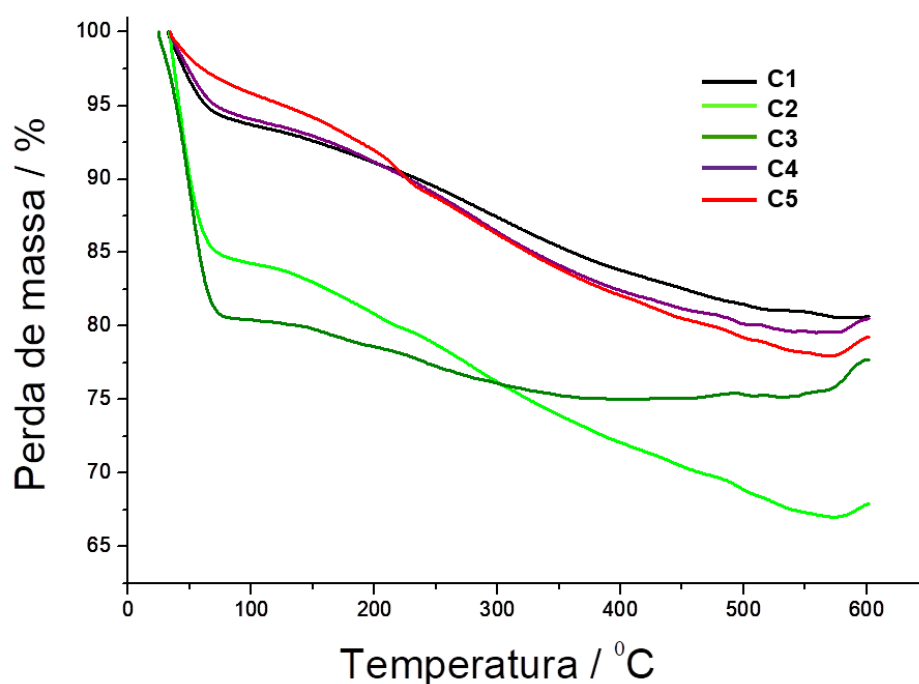


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

6.3.3 Análise térmica

A análise térmica forneceu informações sobre as transformações físicas e químicas que ocorreram durante o aquecimento dos cimentos. A estabilidade térmica das amostras foi avaliada através da análise da curva TG (Figura 30).

Figura 30. Curvas TG dos cimentos desenvolvidos: C1, C2, C3, C4 e C5.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A curva TG dos cimentos mostra que ocorreu dois estágios de perda de massa. No primeiro, a perda de massa pode ser atribuída à perda de água adsorvida aos componentes dos cimentos, incluindo a HA, DCPA, gelatina e quitosana (GUERRA-LÓPEZ et al., 2015; MIYAZAKI et al., 2009; NETO et al., 2005; RAMIREZ-AGUDELO et al., 2018).

No segundo estágio, a perda de massa ocorreu de forma contínua entre 80-600°C, podendo ser atribuída a diferentes eventos. Entre 200 a 400°C ocorre a decomposição térmica da quitosana e da gelatina (NETO et al., 2005; RAMIREZ-AGUDELO et al., 2018). Na faixa de 200 a 600°C, a perda de massa

também pode estar relacionada à perda de água intracristalina e à redução do grupo OH⁻ presente nas HAs (GUERRA-LÓPEZ *et al.*, 2015; STIPNIECE *et al.*, 2014).

Todos os cimentos exibiram alto percentual de massa residual, o que pode ser atribuído à estabilidade térmica da HA e do DCPA, e também a presença de resíduo carbonizado da quitosana (Tabela 9). Os maiores percentuais de perda de massa ocorreram nos cimentos contendo HA co-substituídas com Sr²⁺/Mg²⁺. De fato, no grupo C2 a perda de massa foi muito pronunciada, quando comparada aos outros grupos, indicando que o mesmo possui menor estabilidade térmica que os demais cimentos desenvolvidos.

Tabela 9. Percentuais de perda de massa, dos cimentos ósseos, ocorrido durante o aquecimento entre 25-600°C.

Amostra:	Perda total de massa em 600°C / (%)
C1	19,42
C2	32,13
C3	22,31
C4	19,56
C5	20,81

Fonte: Dados as pesquisa, 2020.

6.3.4 Teste de presa

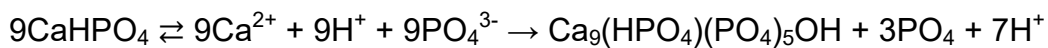
As características de presa dos cimentos exercem influencia sobre sua aplicabilidade clínica e por isso foram consideradas durante o desenvolvimento dos cimentos ósseos à base de HAs co-substituídas por Mg²⁺/Sr²⁺ ou Zn²⁺/Sr²⁺. Após testes preliminares para avaliar a consistência das pastas de cimentos, a razão pó / líquido de 0,7 foi estabelecida para realização de todos os experimentos. A consistência das pastas moldáveis obtidas foi satisfatória e pode permite fácil aplicação ao defeito ósseo.

Algumas reações podem estar envolvidas no processo de endurecimento dos cimentos desenvolvidos. Os sais de Na₂HPO₄ e CaCl₂, adicionados a fase líquida, podem facilmente reagir para formar HA (FULMER

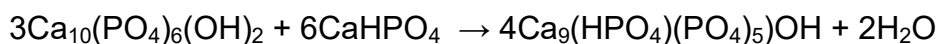
e BROWN, 1993), a qual pode se precipitar auxiliando no endurecimento dos cimentos, conforme representado na Equação (8):



Por outro lado, a hidrólise do DCPA fornece íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , que podem se ligar formando HADC (BROWN, 1999), como representado na Equação (9):



Durante a reação, são liberados íons de hidrogênio, que reduzem o pH e podem promover o aumento da solubilidade das partículas de HA (CZECHOWSKA et al., 2016). Assim, a mistura de CaHPO_4 e HA pode resultar numa reação ácido-base formando HADC (BROWN, 1992), conforme representado na equação (10):



Adicionalmente, o Na_2HPO_4 pode atuar reduzindo o tempo de presa dos cimentos por fornecer PO_4^{3-} para solução, o que resulta no aumento do grau de saturação em apatita e conseqüentemente na dissolução linear do DCPA. Em outras palavras, a presença de Na_2HPO_4 evita que ocorra formação precoce de HADC, a qual recobriria prematuramente o DCPA não reagido, diminuindo sua dissolução e tornando a cinética de presa mais lenta (Ishikawa, 2010).

Os tempos de endurecimento inicial e final dos cimentos obtidos foram medidos usando agulhas Gillmore, de acordo com o Padrão ASTM, e estão representados na tabela 10. Os tempos de presa inicial e final dos cimentos contendo apenas HA, na fase em pó, foram muito longos para atender as demandas de aplicação clínica. Esses resultados podem ser explicados pela presença de gelatina e quitosana na fase líquida. Quando esses polímeros são solubilizados em água ocorre à formação de um gel que encapsula parcialmente as partículas de HA, diminuindo a hidratação e reação do cimento ósseo, o que pode prolongar o tempo de presa (CHIANG et al., 2010; CZECHOWSKA et al., 2016).

Por outro lado, a incorporação de DCPA na composição resultou na diminuição dos tempos de endurecimento dos cimentos. Foram obtidos tempos de presa inicial de 17 a 23 minutos e a presa final ocorreu entre 33–39 minutos. Portanto, além de conferir vantagens adicionais de biocompatibilidade, o DCPA pode atuar também auxiliando na redução do tempo de endurecimento dos cimentos ósseos.

Tabela 10. Tempos de presa inicial e final dos cimentos ósseos desenvolvidos.

Amostra:		Tempo de Presa inicial / (minutos)	Tempo de Presa final / (minutos).
C1	Pó: HA	30	55
	Pó: HA + DCPA	19	34
C2	Pó: HA	33	58
	Pó: HA + DCPA	20	36
C3	Pó: HA	42	60
	Pó: HA + DCPA	23	39
C4	Pó: HA	31	57
	Pó: HA + DCPA	18	35
C5	Pó: HA	32	56
	Pó: HA + DCPA	17	33

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Clinicamente, o tempo de endurecimento final dos cimentos ósseos deve ser idealmente controlado entre 15 a 25 minutos (QI *et al.*, 2013). A pasta de cimento deve ser preparada e colocada no defeito ósseo antes do tempo de endurecimento inicial e a ferida deve ser fechada idealmente após o tempo final de presa (DOROZHKIN, 2011). De fato, um processo de endurecimento muito longo pode causar desintegração do cimento endurecido em contato com os fluidos fisiológicos (WU *et al.*, 2008). No entanto, a adição de quitosana e gelatina promoveram excelentes propriedades de coesão e viscosidade,

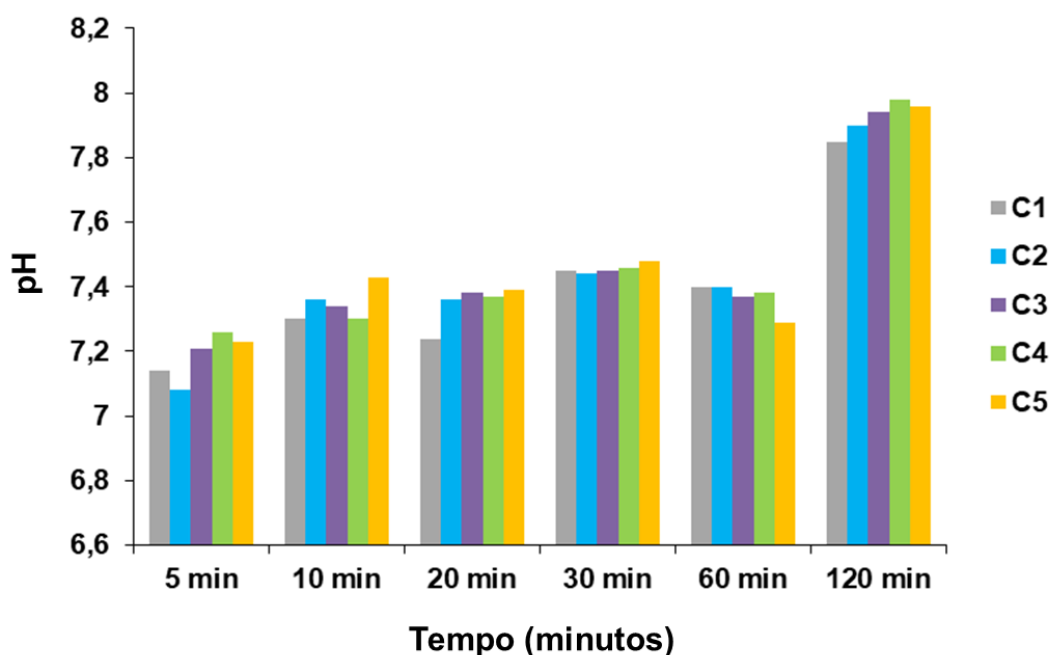
conferindo ótimos resultados de resistência a lavagem para os cimentos desenvolvidos.

Assim, apesar dos tempos de endurecimento dos cimentos contendo HA e DCPA terem excedido levemente os valores ótimos sugeridos para o tempo de presa final (de 15 a 25 minutos), eles podem ser adequados para aplicações cirúrgicas. Pois a resistência à lavagem conferida pela quitosana e gelatina, evita a desintegração dos cimentos em contato com os fluidos fisiológicos.

6.3.5 Teste de pH

As variações de pH ocorridas no FCA durante a incubação do cimentos desenvolvidos foram semelhantes para todas as amostras. Após 5 minutos da imersão dos cimentos, o pH variou de 7,4 – 7,51 aumentando para 7,85 – 7,96, após 120 minutos. Houve uma tendência de aumento durante os 120 minutos iniciais do experimento, embora tenha ocorrido uma pequena redução para 7,29 – 7,4 após 60 minutos (Figura 31).

Figura 31. Variação do pH dos cimentos, imersos em FCA, após 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos da presa dos cimentos.

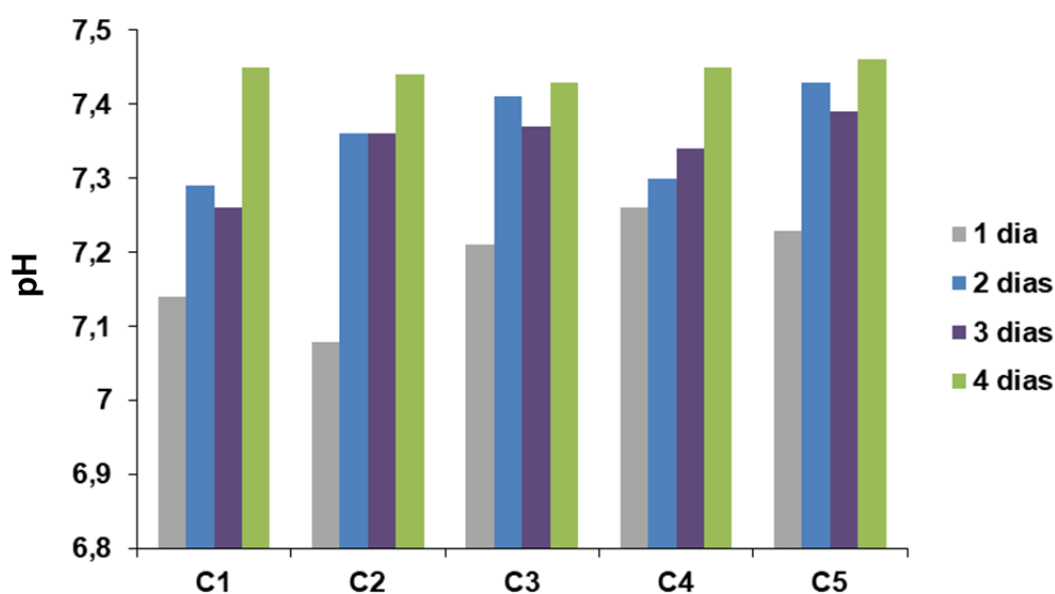


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Os resultados sugerem a presença de íons não reagidos na matriz dos cimentos (Na^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+}). Parece ter ocorrido uma difusão desses íons para o FCA, contribuindo para o aumento inicial dos valores de pH. Essas interações podem ser benéficas, pois o aumento inicial do pH favorece a adesão e a atividade celular (LEE *et al.*, 2017).

As alterações de pH ocorridas, durante quatro dias de incubação dos cimentos em FCA, mostraram que após um dia o pH apresentou uma redução para 7,08 – 7,26. Porém, após dois dias de imersão houve um aumento para 7,3 – 7,43 e o pH se manteve relativamente estável em torno de 7,4, após o terceiro e quarto dias de experimento (Figura 32).

Figura 32. Variação do pH dos cimentos, imersos em FCA, após 1 a 4 dias da presa dos cimentos.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

De fato, ocorreram pequenas alterações de pH durante o período de teste e embora tenha havido uma redução após 24 horas, as soluções de FCA mantiveram um pH neutro, com valores sempre acima de 7,0. A manutenção dessas condições é importante porque o cultivo de osteoblastos em meio ácido pode resultar no aumento de autofagia e apoptose celular (ZHANG *et al.*, 2017). Além disso, o cultivo de queratinócitos e fibroblastos humanos em

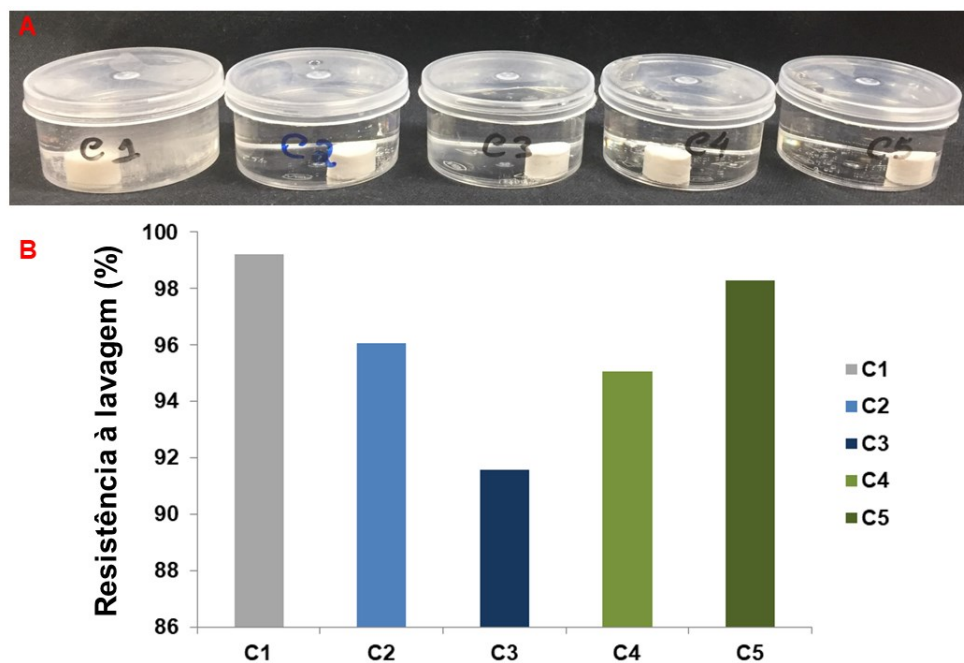
ambientes ácidos resulta na redução da migração celular e no aumento da expressão de mediadores inflamatórios (KRUSE *et al.*, 2017). Por outro lado, foi demonstrado que o pH alcalino pode ser benéfico para o cultivo de células ósseas, pois aumenta o percentual de crescimento e diferenciação das células MC3T3 (GALOW *et al.*, 2017).

6.3.6 Teste de resistência à lavagem

A resistência à lavagem é a capacidade do cimento de manter sua coesão e não se desintegrar em contato com sangue, água ou solução aquosa. Isto é muito importante porque o sangramento cirúrgico está presente em cirurgias de reparo de defeitos ósseos e alveoloplastia (ZHOU *et al.*, 2015). Portanto, é essencial que os cimentos ósseos apresentem um bom desempenho antilavagem. Nesse contexto, a adição de quitosana e gelatina a fase líquida dos cimentos pode ser muito vantajosa, pois esses polímeros são reconhecidos por melhorar as propriedades de resistência à lavagem dos cimentos ósseos (ARYAEI *et al.*, 2015; CHIANG *et al.*, 2010).

Todos os testes foram realizados em triplicata e após 2 horas de agitação mecânica a uma velocidade de 80 rpm, a resistência à lavagem dos cimentos C1, C2, C3, C4 e C5 foi respectivamente de 99,2%, 96,1%, 91,6%, 95% e 98,3% (Figura 33, A). Não foi visualizada nenhuma desintegração perceptível das amostras e todos os cimentos ósseos demonstraram excelente resistência à lavagem (Figura 33, B).

Figura 33. A: Avaliação visual dos cimentos ósseos após o teste de resistência a lavagem. B: Porcentagem de resistência à lavagem dos cimentos C1, C2, C3, C4 e C5.

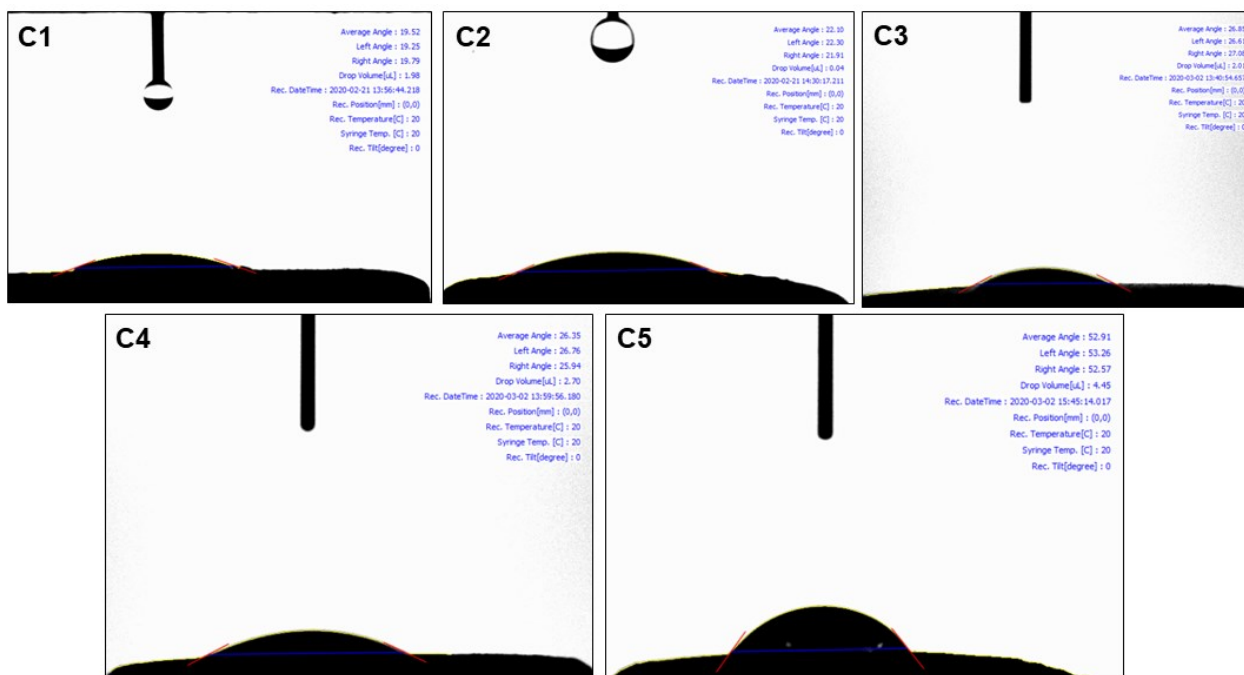


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

6.3.7 Molhabilidade

As características de molhabilidade de um material são determinantes para sua biocompatibilidade e capacidade de adsorção de proteínas. Em geral, quanto menor o ângulo de contato da água em contato com o material, melhor sua molhabilidade e hidrofobicidade (LI *et al.*, 2009). A molhabilidade dos cimentos ósseos desenvolvidos foi avaliada pela medição do ângulo de contato da água sobre a superfície dos mesmos (Figura 34).

Figura 34. Imagens da medida do ângulo de contato da água sobre a superfície dos cimentos, após 1 segundo de experimento.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Os resultados indicam que todos os cimentos possuem alta molhabilidade. Embora o cimento C5 tenha apresentado maior valor de ângulo de contato no tempo de 1 segundo, seu caráter hidrofílico é evidenciado após 30 segundos de experimento (Tabela 11).

Os biopolímeros presentes nos cimentos podem ter influenciado suas características de molhabilidade, pois formam um gel que encapsula parcialmente as partículas de HA e DCPA. Embora a quitosana apresente características hidrofílicas (YE *et al.*, 2014), a presença de gelatina parece contribuir com a alta hidrofiliicidade das superfícies dos cimentos devido a sua alta capacidade de absorção de água (LAGUTA *et al.*, 2017).

De fato, as superfícies com alta hidrofiliicidade são favoráveis à adsorção de proteínas e exibem maior capacidade de adesão e espalhamento de osteoblastos (NAKAMURA, NAGAI e YAMASHITA, 2011; MORALEDA, SAN ROMAN e RODRIGUEZ-LORENZO, 2013). Assim, o desenvolvimento de biomateriais hidrofílicos pode ser vantajoso para proporcionar melhores resultados de regeneração e reparo tecidual.

Tabela 11. Medidas de ângulo de contato nos cimentos após 1 e 30 s de experimento.

Amostras:	Tempo/s	Ângulo de contato/°
C1	1	19,52
	30	10,76
C2	1	22,1
	30	16,71
C3	1	26,85
	30	13,31
C4	1	26,35
	30	14,22
C5	1	52,91
	30	33,61

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

6.3.8 Imersão em água deionizada e mudanças na concentração de íons

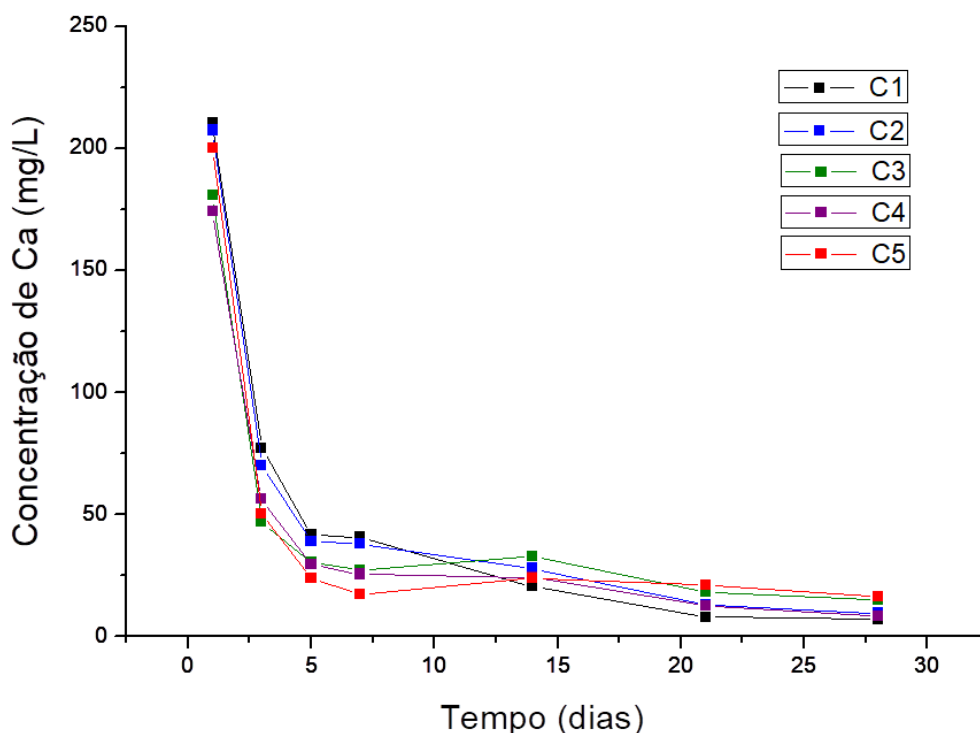
A análise de absorção atômica foi realizada para avaliar as alterações das concentrações dos íons Ca, Mg, Sr e Zn na água deionizada, após imersão do cimento por 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias. Pode-se observar que todos os cimentos apresentaram o mesmo perfil de liberação. As maiores concentrações foram observadas após um dia, ocorrendo um decréscimo contínuo após cada intervalo de tempo, até o período de 28 dias.

As flutuações das concentrações de íons estão relacionadas às reações de precipitação-dissolução (ELAHPOUR *et al.*, 2018). O perfil de liberação dos cimentos pode ser explicado pelo fato dos íons gerados nos processos de dissolução, que ocorreram durante a reação de presa, terem permanecido nas matrizes dos cimentos, sendo facilmente liberados após um dia de imersão em água deionizada. Além disso, concentrações mais altas de Ca foram detectadas nos estágios iniciais da imersão principalmente devido à dissolução do DCPA não hidratado (ZHANG *et al.*, 2015). Somado a isso, a HADC formada durante a reação de presa pode ser mais facilmente solubilizada.

Assim, as maiores concentrações de íons foram observadas após um dia de experimento. Por outro lado, a redução contínua das concentrações de íons parece estar relacionada à estabilidade de degradação das HAs. Essa condição pode ser vantajosa, porque após as interações iniciais, uma porcentagem considerável de Ca, Mg, Sr e Zn pode permanecer nas HAs e servir como um reservatório para auxiliar a osseointegração e regeneração óssea (MASAELI *et al.*, 2016). Além disso, uma liberação repentina de íons nas primeiras 24 horas de imersão pode facilitar os eventos iniciais de adesão e proliferação das células MC3T3 (XIAO *et al.*, 2018).

A figura 35 mostra o perfil de liberação do Ca. Após um dia foram observadas elevadas concentrações (174,21 – 210,26 mg/L) seguido de um decréscimo contínuo até atingir as concentrações de 7,1 – 16,37 mg/L, em 28 dias. A concentração total acumulada de Ca liberada durante 28 dias variou de 330,86 – 405,62 mg/L. O cimento C1 liberou a maior concentração de Ca e esse resultado pode ser explicado pelo fato da HA-P, presente na sua composição, possuir maior teor de Ca que as HAs co-substituídas que compõem os demais cimentos. O perfil de liberação de Ca apresentado pelos cimentos desenvolvidos pode contribuir para a regeneração óssea, uma vez que, altas concentrações desse íon podem atuar nos processos de mineralização (ELAHPOUR *et al.*, 2018).

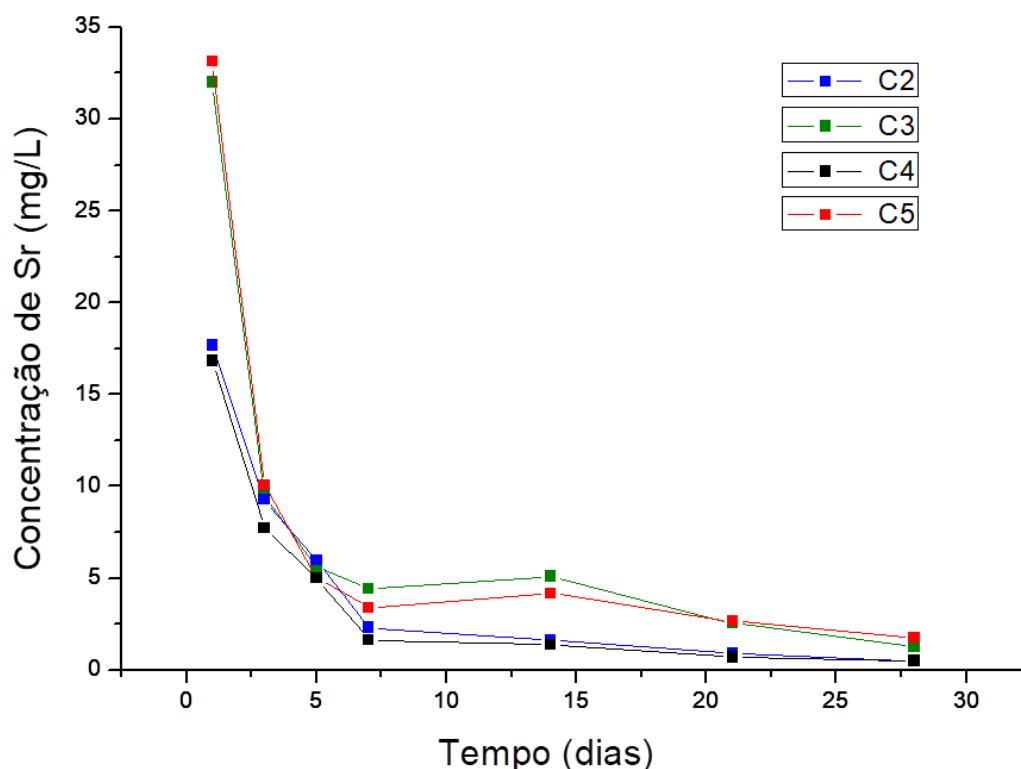
Figura 35. Concentração de cálcio na água deionizada, após a imersão dos cimentos ósseos por 28 dias.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O perfil de flutuação nas concentrações dos íons Sr, Mg e Zn exibiram um comportamento semelhante ao do íon Ca. A liberação de Sr observada para os cimentos C2, C3, C4 e C5 demonstra que após um dia de imersão em água deionizada, as concentrações variaram de 16,83 – 33,14 mg/L. A concentração total acumulada liberada durante 28 dias variou de 60,43 – 33,78 mg/L. Os cimentos C3 e C5 liberaram as maiores concentrações totais de Sr, 60,43 e 60,22 mg/L, respectivamente (Figura 36). Os resultados estão em acordo com os maiores percentuais de substituição de Ca por Sr, presente na HA-SrMg5% e HA-SrZn5%. Essas concentrações de Sr são consideradas não tóxicas e estão dentro das doses indicadas para afetar positivamente a cultura de osteoblastos *in vitro*, que são de 0,1 – 5 mM (BARBARA *et al.*, 2004; BRAUX *et al.*, 2011) e equivalem a ~ 8,8 – 438 mg/L de Sr.

Figura 36. Concentração de estrôncio na água deionizada, após a imersão dos cimentos ósseos por 28 dias.



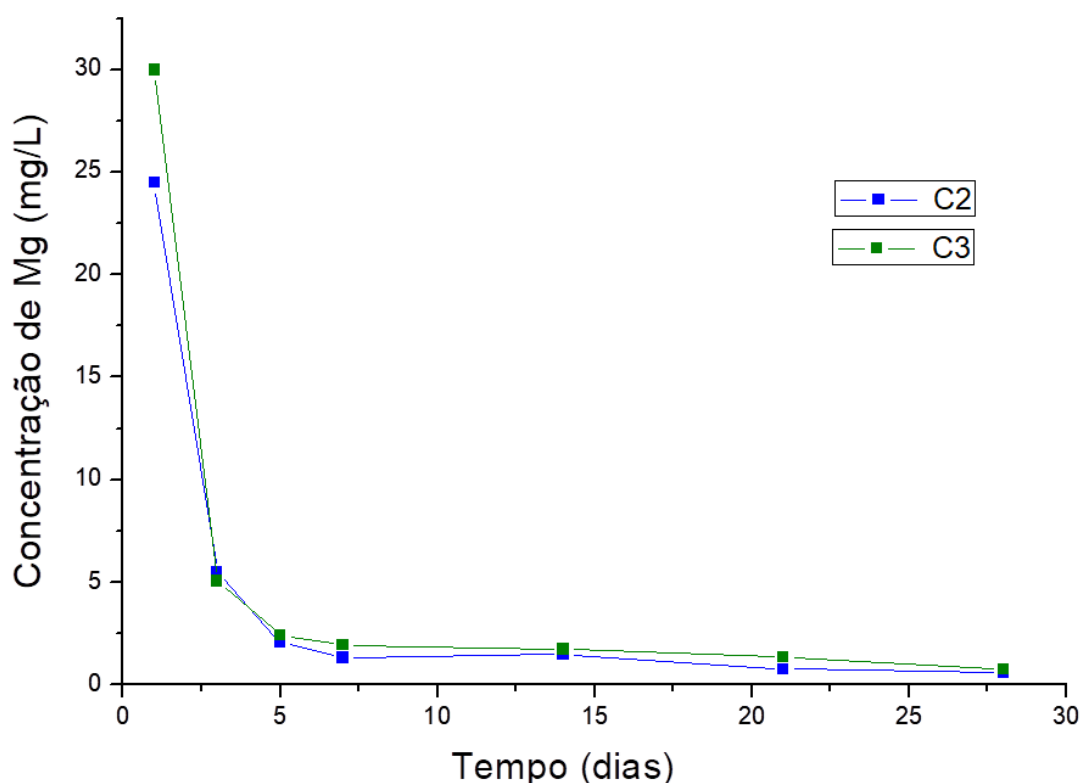
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

As concentrações de Mg exibidas pelos cimentos C2 e C3, após um dia de imersão em água deionizada, foram respectivamente de 24,48 e 29,97 mg/L. As concentrações totais acumuladas durante 28 dias foram de 36,23 mg/L para o cimento C2 e de 43,32 mg/L para cimento C3 (Figura 37). As taxas de liberação parecem estar relacionadas com o maior percentual Mg presente na HA-SrMg5%, quando comparado a HA-SrMg2,5%.

Os níveis de Mg liberados pelos cimentos podem favorecer a regeneração óssea, pois estão de acordo com as doses relatadas por induzir o crescimento celular em culturas de osteoblastos. De fato, a proliferação de osteoblastos humanos e a atividade da enzima fosfatase alcalina foram marcadamente estimuladas pela presença de Mg nas concentrações de 1 mM a 3 mM (40,3 mg/L a 120,91 mg/L) (LEIDI *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2016). Porém,

concentrações de 5,0 mM (201,52 mg/L) de Mg exerceram um papel inibitório (LEIDI *et al.*, 2011). Por outro lado, concentrações de Mg abaixo de 10mM (403,04 mg/L) foram benéficas para o crescimento de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (MARADZE *et al.*, 2018).

Figura 37. Concentração de magnésio na água deionizada, após a imersão dos cimentos ósseos por 28 dias.

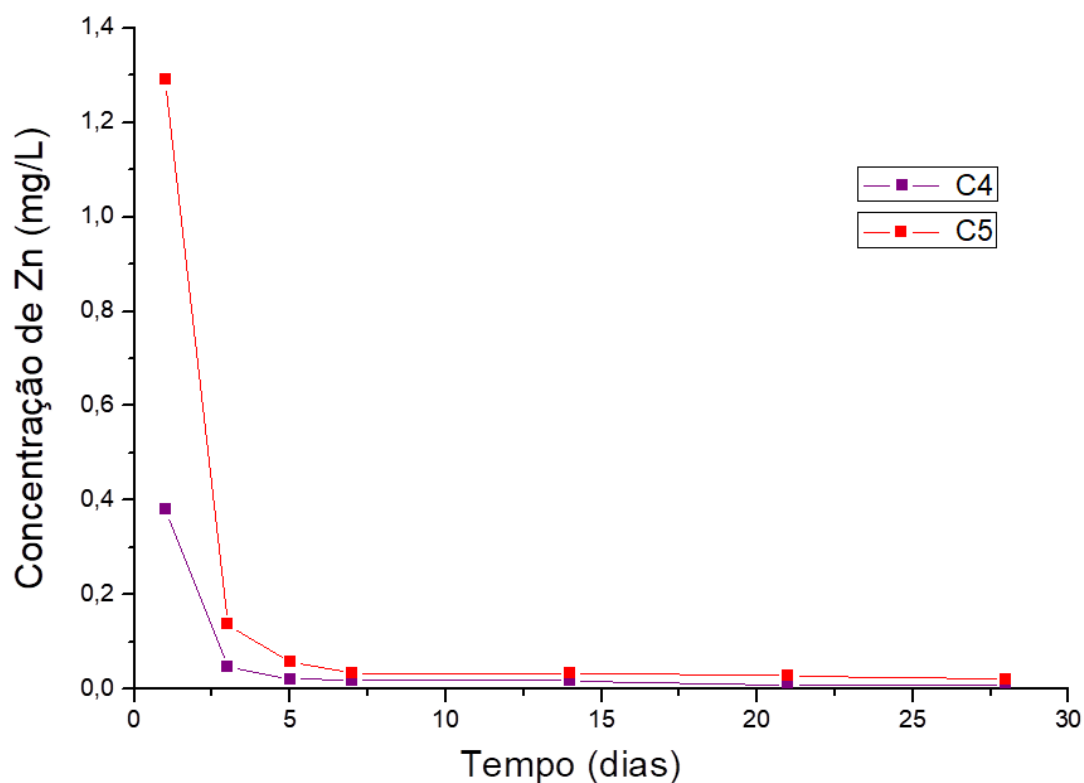


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A concentrações de Zn liberadas pelos cimentos C4 e C5, após um dia, foram respectivamente de 0,38 e 1,29 mg/L e as concentrações totais acumuladas durante 28 dias foram de 0,5 mg/L (C4) e 1,6 mg/L (C5). As diferenças de concentrações encontradas também estão em acordo com o maior percentual Zn presente na HA-SrZn5%, quando comparado a HA-SrZn2,5% (Figura 38). Além disso, as concentrações de Zn liberadas pelos cimentos estão dentro do intervalo considerado ótimo para estimulação da osteogênese. Os efeitos positivos do Zn na proliferação de osteoblastos

ocorrem em doses de 1 a 50 μM (0,065 – 3,26 mg/L); doses acima desse intervalo inibem a atividade osteogênica e abaixo não têm efeitos mensuráveis (O'Connor *et al.*, 2020).

Figura 38. Concentração de zinco presente em água deionizada, após a imersão dos cimentos ósseos por 28 dias.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

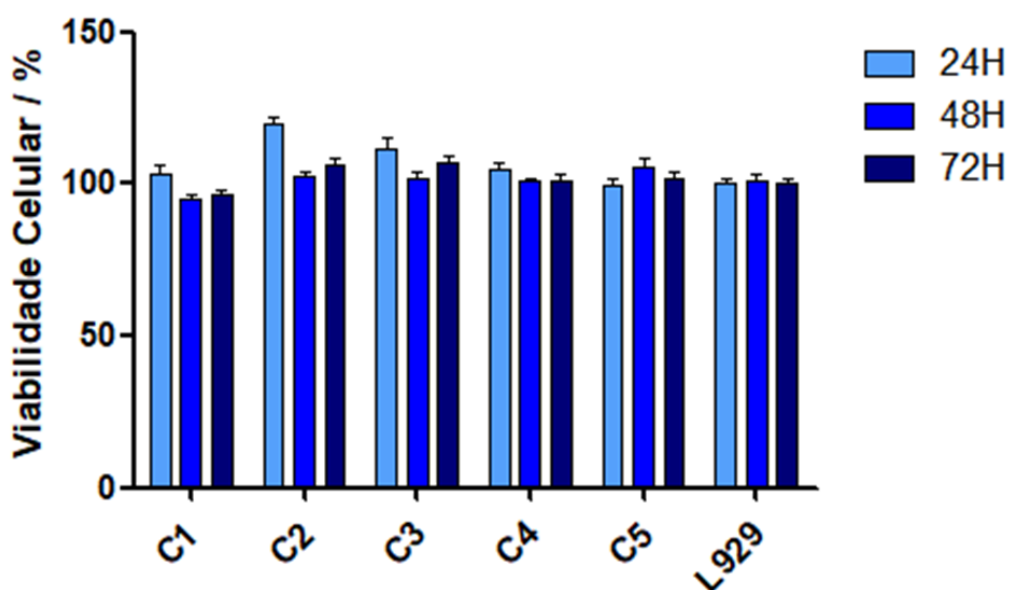
6.4 Testes biológicos *in vitro* dos Cimentos

6.4.1 Citotoxicidade dos Cimentos Ósseos

A citotoxicidade dos cimentos ósseos foi testada em cultura de células fibroblásticas de camundongo (L929). O teste de viabilidade celular em cultura de fibroblastos é importante, porque essas células estão envolvidas no processo de cicatrização de feridas (PITZ *et al.*, 2016). O teste de MTT demonstrou que os cimentos não apresentaram citotoxicidade, após 24, 48 e

72 horas de contato indireto com as células L929. Após 24 horas, a viabilidade celular dos grupos C2 e C3 foram significativamente maiores que a do grupo controle ($P < 0,001$), porém não houve diferenças significativas após esse período. O crescimento celular do grupo C2 foi significativamente maior que de todos os outros grupos em estudo, após 24 horas de experimento (Figura 39).

Figura 39. Ensaio de redução do MTT, após contato indireto dos cimentos ósseos com fibroblastos L929, após 24, 48 e 72 horas.

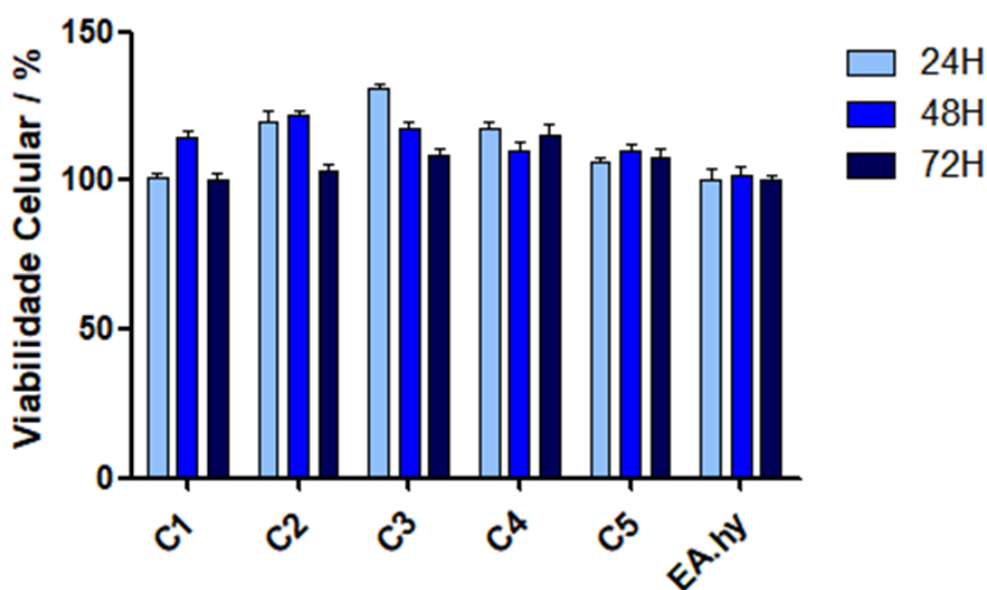


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Durante a cicatrização de feridas e nos processos de osseointegração e regeneração óssea ocorre a angiogênese, que é caracterizada pela neo formação de vasos que fornecem nutrientes e oxigênio para os tecidos e materiais enxertados (LIU *et al.*, 2020). Assim, a viabilidade das células endoteliais EA.hy926, em contato indireto com os cimentos desenvolvidos, também foi avaliada. Os cimentos não foram citotóxicos para as células EA.hy926, após 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular de todos os grupos de cimento foi maior que a do grupo controle, após 24, 48 e 72 horas. Essas diferenças foram estatisticamente significativas para o cimento C1 (após 48 horas, $p < 0,01$), para os cimentos C2 e C3 (após 24 e 48 horas, $p < 0,001$) e para o cimento C4 (após 24 e 72 horas, $p < 0,001$). Após 24 horas, o

percentual de células viáveis do grupo C3 foi significativamente maior que em todos os outros grupos em estudo, porém não houve diferenças significativas após esse período (Figura 40).

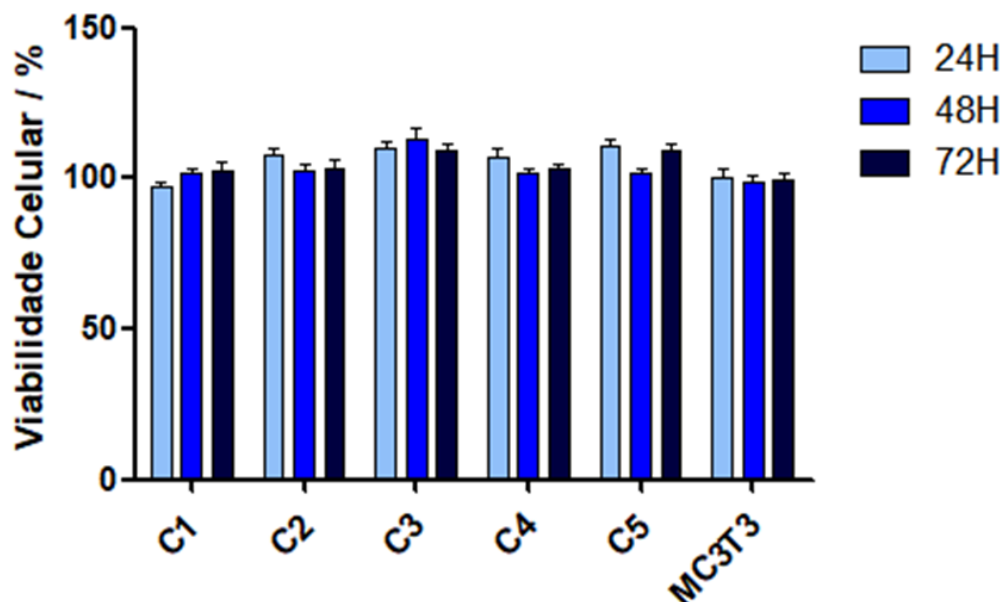
Figura 40. Ensaio de redução do MTT, após contato indireto dos cimentos ósseos com as células endoteliais EA.hy926, após 24, 48 e 72 horas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Para testar a citotoxicidade dos cimentos ósseos em osteoblastos foi utilizada a linhagem de células pré-osteoblásticas MC3T3. Os cimentos não apresentaram citotoxicidade, após 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular dos grupos C2, C3, C4 e C5 foram maiores que a do grupo controle, após 24, 48 e 72 horas. Essas diferenças foram estatisticamente significativas somente para os grupos C3 (24, 48 e 72 horas) e C5 (24 e 72 horas). O crescimento celular do grupo C3 foi significativamente maior que todos os outros grupos em estudo após 48 horas de experimento, mas não houve diferenças significativas após esse período (Figura 41).

Figura 41. Ensaio de redução do MTT, após contato indireto dos cimentos ósseos com as células pré-osteoblásticas MC3T3, após 24, 48 e 72 horas.



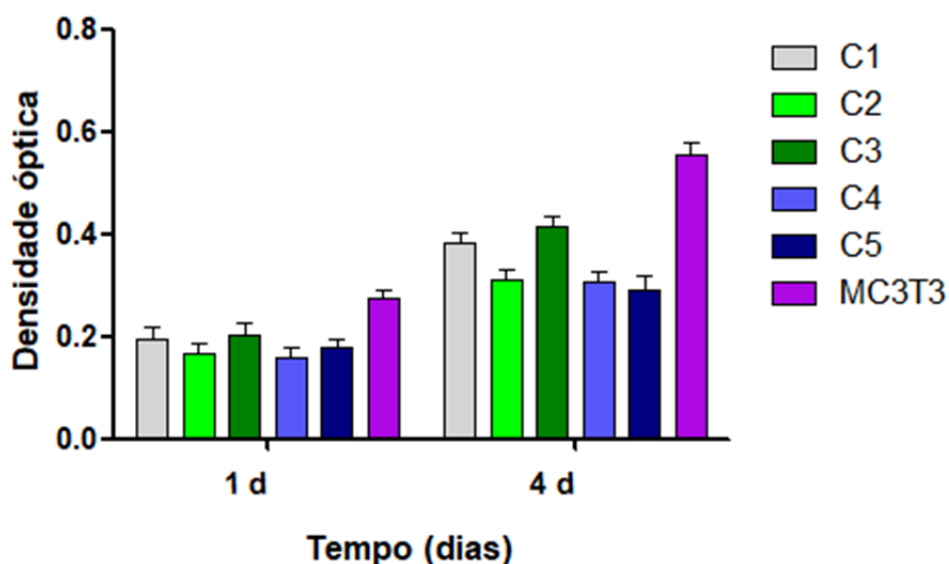
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A avaliação da biocompatibilidade de biomateriais recém-desenvolvidos é muito útil para definir suas possíveis aplicações. Assim, o MTT tem sido amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade de biomateriais (ZHU *et al.*, 2017). A biocompatibilidade dos cimentos desenvolvidos foi comprovada pelos testes de MTT e é um fator fundamental para sua aplicação clínica. Os cimentos exibiram excelente biocompatibilidade *in vitro* em culturas de células fibroblásticas, endoteliais e osteoblásticas. Em geral, os cimentos contendo HA co-substituída demonstraram maior crescimento celular que os grupos C1 e controle, porém as diferenças foram significativas apenas entre alguns grupos. No entanto, os resultados demonstram que os cimentos contendo HA co-substituída com Mg e Sr tiveram melhores resultados de viabilidade celular, indicando que os cimentos C2 e C3 possam apresentar melhor desempenho em estimular o crescimento de células envolvidas nos processos de cicatrização e regeneração óssea.

6.4.2 Teste de Proliferação

A proliferação de células MC3T3 semeadas sobre os discos de cimento e poços controle foi avaliada usando o ensaio de MTT. Os valores de densidade óptica (D.O) nos fornece um indicador do crescimento e proliferação celular. Todos os cimentos desenvolvidos promoveram a proliferação das células MC3T3, após um e quatro dias de experimento. A média de D.O do grupo controle foi significativamente maior que a de todos os grupos de cimento, após os períodos de teste. As médias de D.O dos grupos C1 e C3 foram maiores que as dos grupos C2, C4 e C5, porém as diferenças foram significativas somente após quatro dias. O grupo C3 exibiu maiores médias de D.O que o grupo C1, após um e quatro dias, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 42).

Figura 42. Teste de proliferação das células pré-osteoblásticas MC3T3 semeadas sobre os cimentos ósseos, após 1 e 4 dias.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Os resultados indicam que os cimentos atuaram como substrato para o crescimento de células pré-osteoblásticas, pois a quantidade de células de todos os grupos aumentou à medida que o tempo de cultura se estendeu de

um para quatro dias. Portanto, os cimentos podem ser considerados citocompatíveis, pois não foram observados efeitos negativos óbvios na viabilidade celular.

Por outro lado, o cimento C1 contendo HA-P promoveu, após quatro dias, uma proliferação celular significativamente superior que a de cimentos contendo HAs co-substituídas (C2, C4 e C5). Nesse contexto, o cálcio (Ca), que é um dos elementos mais importantes do osso natural, tem grandes efeitos na atividade osteogênica e na neo-formação óssea (LEI *et al.*, 2017). Assim, os excelentes resultados de indução proliferativa exibido pelo cimento C1 podem ser explicados pela liberação de maiores concentrações de cálcio deste cimento, quando comparado aos demais grupos.

No entanto, as composições químicas influenciam a quantidade de íons liberados dos biomateriais e conseqüentemente as funções celulares (LU *et al.*, 2011). De fato, as concentrações de Ca, Sr e Mg ou Zn, liberadas pelo grupos C2, C3, C4 e C5, foram apropriadas para promover a proliferação de células MC3T3. Além disso, o cimento C3, contendo HA-SrMg5%, exibiu melhor desempenho de proliferação celular que todos os grupos de cimento e embora as diferenças não tenham sido significativas em relação ao cimento C1, um maior tempo de experimento talvez possa elucidar melhor o desempenho desses cimentos na indução da proliferação celular.

De fato, os íons Sr^{2+} , liberados por biomateriais, aumentam a proliferação e diferenciação de osteoblastos (LEI *et al.*, 2017). Além disso, a liberação de íons Mg e Ca associada a dissolução contínua dos cimentos ósseos resulta num ambiente rico nesses íons, que pode ser responsável por estimular a proliferação e diferenciação de células ósseas (LU *et al.*, 2011). Por outro lado, o Zn tem sido reconhecido por promover a proliferação de osteoblastos (O'CONNOR *et al.*, 2020).

Assim, a excelente citocompatibilidade exibida pelos cimentos desenvolvidos demonstra o potencial destes biomateriais para favorecer a adesão, espalhamento e proliferação celular. Portanto, os resultados demonstrados criam condições para que os testes de biocompatibilidade e proliferação celular sejam aprofundados.

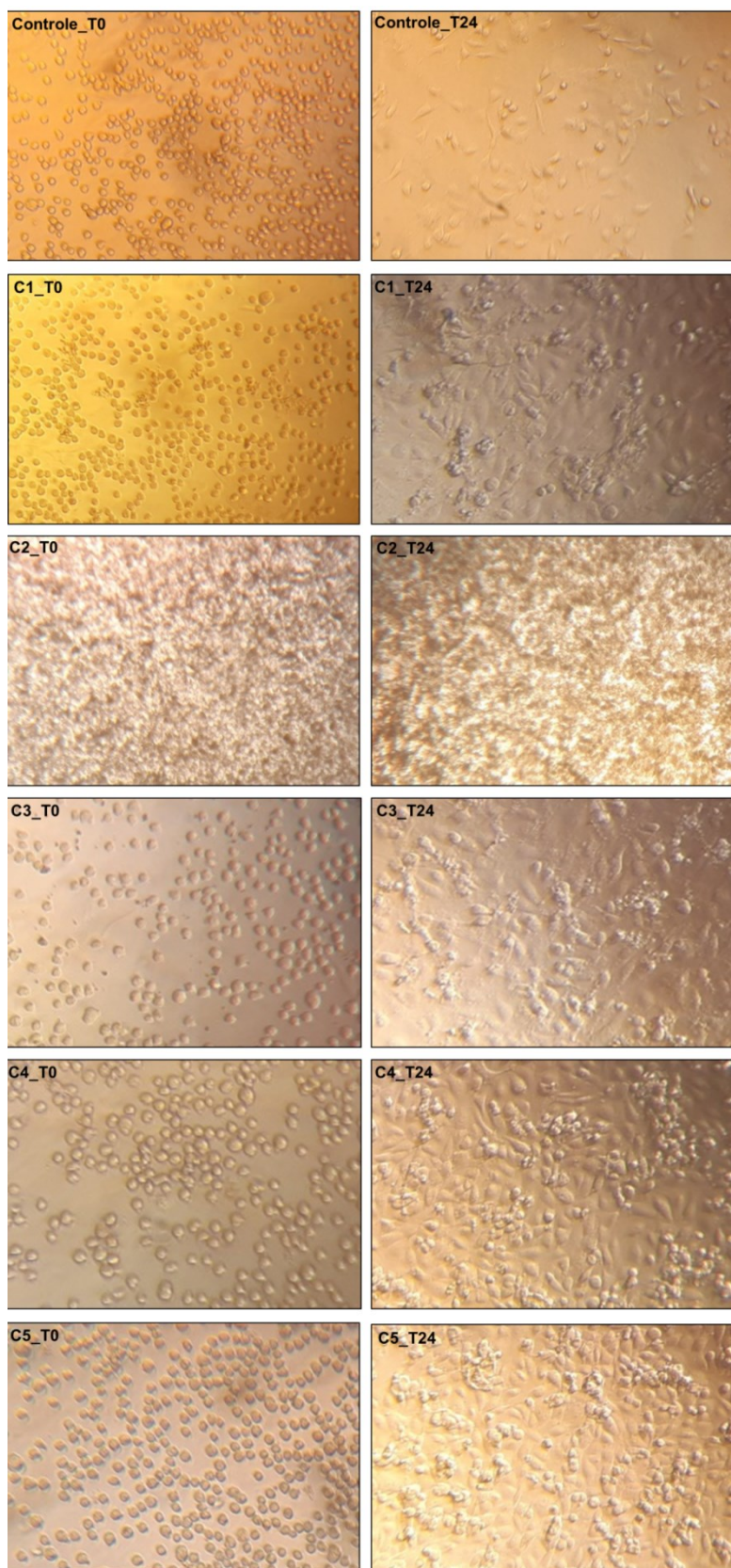
6.4.3 Teste de formação de tubo

O potencial angiogênico dos cimentos desenvolvidos foi avaliado pelo teste de formação de tubos. As células endoteliais revestem a superfície interior dos vasos sanguíneos e são responsáveis pela morfogênese e ramificação de vasos (MOCCIA *et al.*, 2019). Portanto, foi explorado o efeito de extratos dos cimentos sobre a angiogênese de células endoteliais da veia umbilical humana imortalizada (EA.hy926). Essas células são consideradas um excelente modelo para avaliação da atividade angiogênica, pois são o produto da fusão entre as células da veia umbilical humana e o clone A549 resistente da tioguanina. Assim, a EA.hy926 possui características morfológicas, fenotípicas e funcionais das células endoteliais humanas, sem a expectativa de vida limitada e a variabilidade entre doadores (LU *et al.*, 2014).

O teste de formação de tubos revelou que após 6 horas as células EA.hy926 alinharam-se para formar estruturas semelhantes a tubos. Após 24 horas, o número de tubos formados aumentou e muitas vezes estes se uniram formando várias junções. As células tratadas com extratos dos cimentos exibiram a formação de um maior número de tubos e junções entre eles (Figura 43).

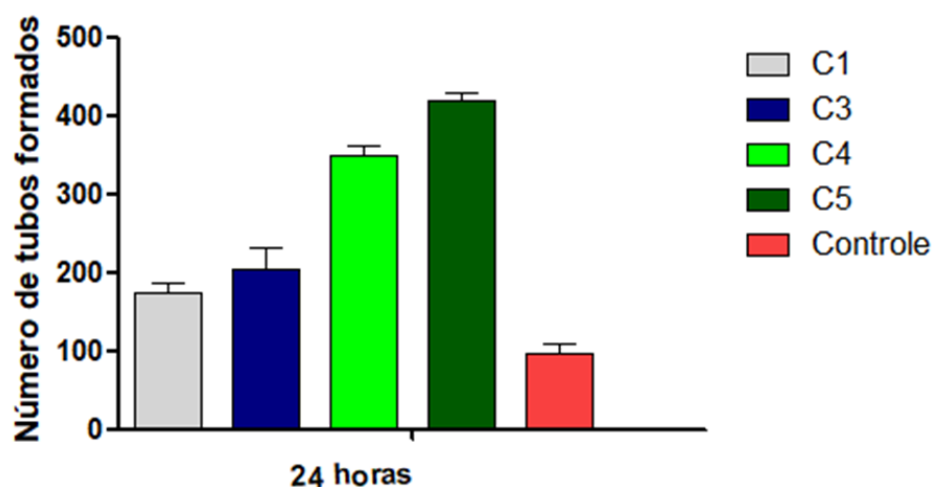
A comparação entre os grupos demonstrou que os cimentos C1, C3, C4 e C5 promoveram a formação de tubos significativamente maior, que o grupo controle (Figura 44). Não foi possível visualizar o efeito do cimento C2 sobre a formação de tubos, pois os extratos destes cimentos continham partículas de HA que dificultaram a visualização das células. Em ordem decrescente, o número de tubos formados pelos grupos foi: C5 > C4 > C3 > C1. Os cimentos C4 e C5 apresentaram significativamente os melhores efeitos de estimulação da formação de estruturas capilares das células EA.hy926 ($p < 0,001$). O efeito estimulador do grupo C5 foi significativamente maior que de todos os grupos em estudo ($p < 0,001$).

Figura 43. Imagens de microscopia óptica do teste de formação de tubos, em cultura de células EA.hy926, dos grupos de cimento e controle nos tempos 0 (imagens à esquerda) e após 24h de experimento (imagens à direita).



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 44. Distribuição do número de tubos formados pelas células endoteliais EA.hy926 em contato com extratos dos cimentos desenvolvidos.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Os resultados exibidos demonstram que todos os cimentos possuem potencial angiogênico. Essa característica provavelmente está relacionada à capacidade destes cimentos em liberar Ca, Sr e Mg ou Zn para o meio. O aumento da concentração de Ca no interior de células endoteliais ativa sinais intracelulares, que podem estimular essas células a sofrerem proliferação, migração e formação de tubos *in vitro* e *in vivo* (MOCCIA *et al.*, 2019). Somado a isso, altas doses de Mg pode induzir a angiogênese *in vitro* (BOSE *et al.*, 2013). Outros estudos demonstraram que polifosfatos de cálcio dopados com Sr aumentaram a proliferação de células endoteliais e a formação de tubos (CHEN *et al.*, 2008; GU *et al.*, 2013). Além disso, os íons Zn aumentam a diferenciação de células endoteliais e a formação de tubo, *in vitro* (ZHU *et al.*, 2018).

Assim, os excelentes resultados de formação de vasos exibidos pelos cimentos C4 e C5 podem estar relacionados à presença de Zn na estrutura das HAs que compõem esses cimentos. O Ca e Sr associados ao Zn parecem ter influenciado mais positivamente a formação de tubos, resultando no alto número de ramificações formadas. De fato, o Zn extracelular participa da

modulação de processos celulares, como a proliferação e a atividade de células endoteliais (ZHU *et al.*, 2018).

Nesse contexto, a promoção da angiogênese precoce é um fator necessário para o sucesso da regeneração óssea. Os vasos recém-formados transportam continuamente nutrientes, oxigênio, e osteoblastos para o local do defeito (SONG *et al.*, 2020). Portanto, os biomateriais não devem fornecer apenas suporte para o crescimento do tecido, mas também condições para introduzir células e fatores de crescimento no defeito ósseo (LIU *et al.*, 2020).

A rede vascular que se forma em um defeito ósseo facilita a migração, diferenciação e formação óssea não apenas pelo suprimento de oxigênio e nutrientes, mas também devido a interação entre as células endoteliais e osteócitos. Quando vascularização é interrompida, a formação óssea é atrasada e reduzida. Portanto, a falha da osteogênese após a implantação de biomateriais, *in vivo*, ocorre principalmente devido à falta de angiogênese na área do defeito ósseo (LIU *et al.*, 2020). Assim, outros trabalhos buscaram o desenvolvimento de biomateriais capazes de induzir a angiogênese e a osteogênese. Song *et al.* (2020) desenvolveram um biocompósito composto por HA, colágeno e Zn e demonstraram sua capacidade de estimular a regeneração óssea e a angiogênese *in vivo*. Além disso, LV *et al.* (2018) desenvolveram um cimento de fosfato de cálcio contendo quitosana e Sr que foi efetivo em estimular a proliferação de células endoteliais (HUVECs), além de promover a formação de tubos *in vitro*.

Assim, a incorporação de íons com potencial angiogênico pode ser uma estratégia para promover a vascularização de biomateriais usados na enxertia óssea (LIU *et al.*, 2020). Portanto, embora seja necessário um aprofundamento dos testes de biocompatibilidade e avaliação da atividade de células em contato com os cimentos desenvolvidos, estas matérias demonstraram um excelente potencial em favorecer a angiogênese e osteogênese.

7 CONCLUSÕES

- O método de co-precipitação, em baixa temperatura, foi efetivo para síntese de HAs de dimensões nanométrica.
- As análises de difração de Raios-X e FTIR demonstraram que a presença e o tipo de substituição resultaram em alterações da rede cristalina das nHAs sintetizadas.
- As nHAs sintetizadas possuem grande potencial para aplicações biológicas, pois exibem uma combinação de características favoráveis que incluem: reduzidas dimensões, baixa cristalinidade, elevada área superficial específica, carga superficial negativa, composição não estequiométrica e presença de diferentes íons na rede cristalina.
- As nHAs exibiram excelente biocompatibilidade e promoveram a proliferação de fibroblastos e osteoblastos. Os resultados indicaram que as nHAs co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} ou Zn^{2+}/Sr^{2+} parecem induzir maior proliferação de células fibroblásticas e osteoblásticas, quando comparadas as nHAs substituídas por Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} . Além disso, as nHAs com porcentagens mais altas de co-substituição parecem induzir maiores percentuais de proliferação celular.
- Os cimentos ósseos desenvolvidos a base de nHAs co-substituídas por Mg^{2+}/Sr^{2+} ou Zn^{2+}/Sr^{2+} apresentaram propriedades de tempo de presa, alterações de pH e molhabilidade, que são adequadas para aplicações cirúrgicas e podem favorecer o crescimento celular.
- Os cimentos apresentaram um perfil de liberação de íons caracterizado por concentrações de Ca, Sr, Mg e Zn consideradas não tóxicas, e dentro das doses indicadas para estimular a proliferação de osteoblastos.
- Os cimentos exibiram excelente biocompatibilidade *in vitro* em culturas de células fibroblásticas, endoteliais e osteoblásticas. Os resultados demonstram que os cimentos contendo HA co-substituída por Mg^{2+}/Sr^{2+} exibiram melhores resultados de viabilidade celular, indicando que os cimentos C2 e C3 podem apresentar melhor desempenho em estimular

o crescimento de células envolvidas nos processos de cicatrização tecidual e regeneração óssea.

- Os resultados do teste de formação de tubos sugerem que todos os cimentos desenvolvidos possuem potencial angiogênico, sendo que os cimentos C4 e C5 exibiram maior indução da formação de vasos.
- Embora seja necessário um aprofundamento dos testes de biocompatibilidade, a incorporação de íons na rede cristalina das nHAs que afetam a angiogênese e a osteogênese, parece ter resultado no desenvolvimento de cimentos ósseos com potencial para promover a regeneração óssea.

REFERÊNCIAS

AINA, V. et al. Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties. **J Mater Sci: Mater Med**, v.23, p.2867-2879, 2012.

AINA, V. et al. Sr-containing hydroxyapatite: morphologies of HA crystals and bioactivity on osteoblast cells. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.33 p.1132-1142, 2013.

ALKHRAISAT, M.H.; CABREJOS-AZAMA, J.; RODRÍGUEZ, C.R.; JEREZ, L.B.; CABARCOS, E.L. Magnesium substitution in brushite cements. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.33, n.1, p.475-481, 2013.

AL-WAFI, R. et al. Fast and easy synthesis of novel Strontium apatite nanostructured phase: Structure, spectroscopy, and dielectric analysis **Ceram Int**, v.43, p.17153-17159, 2017.

ANWAR, A.; AKBAR, S.; SADIQA, A.; KAZMI, M. Novel continuous flow synthesis, characterization and antibacterial studies of nanoscale zinc substituted hydroxyapatite bioceramics. **Inorganica Chim Acta**, v.453, p.16-22, 2016.

APARICIO, C.; GINEBRA, M.P. **Biom mineralization and Biomaterials: Fundamentals and Applications**. 1 ed. Elsevier Science, 2015.

ARYAEI, A.; LIU, J.; JAYATISSA, A.H.; JAYASURIYA, A.C. Cross-linked chitosan improves the mechanical properties of calcium phosphate–chitosan cement. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.54, p.14-19, 2015.

AZIZEH-MITRA, Y., OUDADESSE, H., AKBARZADEH, R., WERS, E., LUCAS-GIROT, A. Physical and biological characteristics of nanohydroxyapatite and bioactive glasses used for bone tissue engineering. **Nanotechnol Rev**, v.3, n.6, p.527-552, 2014.

BARBARA, A.; DELANNOY, P.; DENIS, B.G.; MARIE, P.J. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. **Metabolism**, v.53, n.4, p.532-537, 2004.

BEGAM, H.; KUNDU, B.; CHANDA, A.; NANDI, S.K. MG63 osteoblast cell response on Zn doped hydroxyapatite (HAp) with various surface features. **Ceram Int**, v.43, p.3752-3760, 2017.

BIANCO, A. et al. F-substituted hydroxyapatite nanopowders: Thermal stability, sintering behaviour and mechanical properties. **Ceram Int**, v.36, p.313-322, 2010.

BIGI, A. et al. The Role of Magnesium on the Structure of Biological Apatites. **Calcif Tissue Int**, v.50, p.439-444, 1992.

BIGI, A.; BOANINI, E.; CAPUCCINI, C.; GAZZANO, M. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. **Inorganica Chim Acta**, v.360, p.1009-1016, 2007.

BIGI, A.; BRACCI, B.; PANZAVOLTA, S. Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement. **Biomaterials**, v.25, p.2893-2899, 2004.

BOANINI, A.E.; GAZZANO, B.M.; BIGI, A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. **Acta Biomater**, v.6, p.1882-1894, 2010.

BOHNER, M.; GBURECK, U.; BARRALET, J.E. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. **Biomaterials**, v.26, p.6423-6429, 2005.

BOSE, S.; SAHA, S.K. Synthesis of Hydroxyapatite Nanopowders via Sucrose Templated Sol-Gel Method. **J Am Ceram Soc**, v.86, n.6, p.1055-57, 2003.

BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. **Acta Biomater**, v.8, p.1401-1421, 2012.

BOSE, S.; FIELDING, G.; TARAFDER, S.; BANDYOPADHYAY, A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. **Trends Biotechnol**, v.31, n.10, p.594-605, 2013.

BOYD, A.R.; RUTLEDGE, A.L.; RANDOLPH, B.; MEENAN, B.J. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings deposited via a co-deposition sputter technique. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.46, p.290-300, 2015.

BRAUX, J. et al. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation. **Acta Biomater**, v.7, n.6, p.2593-2603, 2011.

BROWN, P.W. Hydration behavior of calcium phosphates is analogous to hydration behavior of calcium silicates. **Cement Concrete Res**, v.29, p.1167-1171, 1999.

BROWN, P.W. Phase Relationships in the Ternary System CaO-P₂O₅-H₂O at 25°C. **J Am Ceram Soc**, v.75, n.1, p.17-22, 1992.

CACCIOTTI, A.I.; BIANCO, A.A.; LOMBARDI, B.M.; MONTANARO, L. Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour. **J Eur Cer Soc**, v.29, p.2969-2978, 2009.

CAPUCCINI, C.; TORRICELLI, P.; BOANINI, E.; GAZZANO, M.; GIARDINO, R.; BIGI, A. Interaction of Sr-doped hydroxyapatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells. **J Biom Mater Res Part A**, v.89, n.3, p.594-600, 2009.

CHADHA, R. K., SINGH, K.L., SHARMA, C., SINGH, A.P., NAITHANI, V. Effect of microwave and conventional processing techniques on mechanical properties of Strontium substituted hydroxyapatite. **Ceram Int**, v.46, n.1, p.1091-1098, 2020.

CHEN, Y.W. et al. Interaction of endothelial cells with biodegradable strontium-doped calcium polyphosphate for bone tissue engineering. **Appl Surf Sci**, v.255, p.331-335, 2008.

CHENG, K.; WENG, W.; WANG, H.; ZHANG, S. In vitro behavior of osteoblast-like cells on fluoridated hydroxyapatite coatings. **Biomaterials**, v.26, p.6288-6295, 2005.

CHENITE, A. et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. **Biomaterials**, v.21, p.2155-2161, 2000.

CHIANG, T.; HO, C.; CHEN, D.C.; LAI, M.; DING, S. Physicochemical properties and biocompatibility of chitosan oligosaccharide/gelatin/calcium phosphate hybrid cements. **Mater Chem Phys**, v.120, p.282-288, 2010.

CHUNG, G.; LONG, H. Systematic strontium substitution in hydroxyapatite coatings on titanium via micro-arc treatment and their osteoblast/osteoclast responses. **Acta Biomater**, v.7, p.4081-4087, 2011.

COX, S.C.; JAMSHIDI, P.; GROVER, L.M.; MALLICK, K.K. Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.35, p.106-114, 2014.

CRUZ, R. et al. Does the incorporation of zinc into calcium phosphate improve bone repair? A systematic review. **Ceram Int**, v.44, p.1240-1249, 2018.

CZECHOWSKA, J.; ZIMA, A.; SIEK, D.; ŚLÓWARCZYK, A. The importance of chitosan and nano-TiHA in cement-type composites on the basis of calcium sulfate. **Ceram Int**, v.42, p.15559-15567, 2016.

DANILCHENKO, S. et al. Thermal transformations of the mineral component of composite biomaterials based on chitosan and apatite. **Cryst Res Technol**, v.45, p.685-691, 2010.

DIAS, A.M.; DA SILVA, F.G.; MONTEIRO, A.P.F.; PINZÓN-GARCÍA, A.D.; SINISTERRA, R.D.; CORTÉS, M.E. Polycaprolactone nanofibers loaded oxytetracycline hydrochloride and zinc oxide for treatment of periodontal disease. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.103, p.109798-109808, 2019.

DOOSTMOHAMMADI, A. et al. Preparation, chemistry and physical properties of bone-derived hydroxyapatite particles having a negative zeta potential. **Mater Chem Phys**, v.132, p.446-452, 2012.

DOROZHKIN, S.V. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. **Materials**, v.2, p.399-498, 2009.

DOROZHKIN, S.V. Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations: Cements, Concretes, Pastes and Putties. **Int J Mater Chem**, v.1, n.1, p.1-48, 2011.

DUAN, X.; LIAO, H.X.; ZOU, H.Z.; ZHANG, Z.J.; YE, J.D.; LIAO, W.M. An injectable, biodegradable calcium phosphate cement containing poly lactic-co-glycolic acid as a bone substitute in ex vivo human vertebral compression fracture and rabbit bone defect models. **Connect Tissue Res**, v.59, n.1, p.55-65, 2018.

EBRAHIMI, M.; BOTELHO, M.G.; DOROZHKIN, S.V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.71, p.1293-1312, 2017.

ELAHPOUR, N.; RABIEE, S.M.; EBRAHIMZADEH, M.H.; MORADI, A. In-vitro formation and growth kinetics of apatite on a new light-cured composite calcium phosphate cement. **Ceram Int**, v.44, n.13, p.15317-15322, 2018.

Elliott, J.C. **Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates**. Amsterdam: Elsevier; 1994.

EVIS, Z.; WEBSTER, T.J. Nanosize hydroxyapatite: doping with various ions. **Adv Appl Ceram**, v.110, n.5, p.311-320, 2011.

EWEIS, M.; ELKHOLY, S.S.; ELSABEE, M.Z. Antifungal efficacy of chitosan and its Thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens, **Int J Biol Macromol**, v.38, p.1-8, 2006.

FAHAMI, A.; BEALL, G.W.; BETANCOUR, T. Synthesis, bioactivity and zeta potential investigations of chlorine and fluorine substituted hydroxyapatite. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.59, p.78-85, 2016.

FARZADI, A.; BAKHSHIB, F.; SOLATI-HASHJIN, M.; ASADI-EYDIVAND, M.; OSMAN, N.A.A. Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. **Ceram Int**, v.40, p.6021-6029, 2014.

FRASNELLI, M. et al. Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.71, p.653-662, 2017.

FULMER, M.T.; BROWN, P.W. Effects of Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4 on hydroxyapatite formation. **J Biomed Mater Res**, v.27, n.8, p.1095-102, 1993.

FUJII, E. et al. Selective Protein Adsorption Property and Characterization of Nano-Crystalline Zinc-Containing Hydroxyapatite. **Acta biomater**, v.2, p.69-74, 2006.

GALOW, A.M.; REBL, A.; KOCZAN, D.; BONK, S.M.; BAUMANN, W.; GIMSA, J. Increased osteoblast viability at alkaline pH in vitro provides a new perspective on bone regeneration. **Biochem Biophys Rep**, v.10, p.17-25, 2017.

GARBO, C. et al. Advanced Mg, Zn, Sr, Si Multi-Substituted Hydroxyapatites for Bone Regeneration. **Int J nanomedicine**, v.15, p.1037-1058, 2020.

GAYATHRI, B.; MUTHUKUMARASAMY, N.; VELAUTHAPILLAI, D.; SANTHOS, S.B.; ASOKAN, V. Magnesium incorporated hydroxyapatite nanoparticles: Preparation, characterization, antibacterial and larvicidal activity. **Arabian J Chem**, v.11, p.645-654, 2018.

GENG, Z. et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of strontium/ magnesium-co-substituted hydroxyapatite. **J Biomater Appl**, v.31, n.1, p.140-151, 2016.

GENG, Z. et al. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of Nanostructured Hydroxyapatite with Different Dimensions. **Nanomaterials**, v.7, n.38, p.1-13, 2017.

GINEBRA, M.; CANAL, C.; ESPANOL, M.; PASTORINO, D.; MONTUFAR, E.B. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. **Adv Drug Deliv Rev**, v.64, p.1090-1110, 2012.

GORGIEVA, S.; KOKOL, V. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. **Biomater Appl Nanomed**, p.17-52, 2011.

GROBARDT, C.; EWALD, A.; GROVER, L.M.; BARRALET, J.E.; GBURECK, U. Passive and Active In Vitro Resorption of Calcium and Magnesium Phosphate Cements by Osteoclastic Cells. **Tissue Eng Part A**, v.16, n.12, p.3687-3695, 2010.

GUERRA-LÓPEZ, J.R.; ECHEVERRÍA, G.A.; GÜIDA, J.A.; VIÑA, R.; PUNTE, G. Synthetic hydroxyapatites doped with Zn(II) studied by X-ray diffraction,

infrared, Raman and thermal analysis. **J Phys Chem Solids**, v.81, p.57-65, 2015.

GU, Z.; XIE, H.; LI, L.; ZHANG, X.; LIU, F.; YU, X. Application of strontium-doped calcium polyphosphate scaffold on angiogenesis for bone tissue engineering. **J Mater Sci Mater Med**, v.24, n.5, p.1251-1260, 2013.

GUTIERRES, M et al. Substitutos Ósseos: Conceitos Gerais e Estado Actual. **Arq Med**, v.19, n.4, p.153-162, 2006.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; HANB, S.S.; KANG, I. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. **RSC Adv**, v.7, p.7442-7458, 2017.

HAO, Y. et al. Evaluation of Osteoinduction and Proliferation on Nano-Sr-HAP: A Novel Orthopedic Biomaterial for Bone Tissue Regeneration. **J Nanosc Nanotech**, v.12, p.207-212, 2012.

HE, Z.; SUN, S.; DENG, C. Effect of Hydroxyapatite Coating Surface Morphology on Adsorption Behavior of Differently Charged Proteins. **J Bionic Eng**, v.17, n.2, p.345-356, 2020.

HE, L.Y.; ZHANG, X.M.; LIU, B.; TIAN, Y.; MA, W.H. Effect of magnesium ion on human osteoblast activity. **Braz J Med Biol Res**, v.49, n.7, p.5257, 2016.

HUANG, Y. et al. Improving the bioactivity and corrosion resistance properties of electrodeposited hydroxyapatite coating by dual doping of bivalent strontium and manganese ion. **Surf Coat Tech**, v.291, p.205-215, 2016.

HUHTAMÄKI, T. et al. Surface-wetting characterization using contact-angle measurements. **Nat Protoc**, v.13, n 7, p.1521-1538, 2018.

IAFISCO, M.; RUFFINI, A.; ADAMIANO, A.; SPRIO, S.; TAMPIERI, A. Biomimetic magnesium–carbonate-apatite nanocrystals endowed with strontium ions as anti-osteoporotic trigger. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.35, p.212-219, 2014.

IMRIE, E.F. et al. Synthesis and Characterisation of Strontium and Magnesium Co-Substituted Biphasic Calcium Phosphates. **Key Eng Mater**, v.529, n.530, p.88-93, 2013.

ISHIKAWA, K. Bone Substitute Fabrication Based on Dissolution Precipitation Reactions. **Materials**, v.3, n.2, p.1138-1155, 2010.

ISHIKAWA, K.; EANES, E.D. The hydrolysis of anhydrous dicalcium phosphate into hydroxyapatite. **J Dent Res**, v.72, n.2, p.474-480, 1993.

KALITA, S.J.; BHATT, H.A. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.27, p.837-848, 2007.

KAVITHA, M.; SUBRAMANIAN, R.; NARAYANAN, R.; UDHAYABANU, V. Solution combustion synthesis and characterization of strontium substituted hydroxyapatite nanocrystals. **Powder Technol**, v.253, p.129-137, 2014.

KAYGILI, O.; KESER, S. Sol-gel synthesis and characterization of Sr/Mg, Mg/Zn and Sr/Zn co-doped hydroxyapatites. **Mater Lett**, v.141, p.161-164, 2015.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How Useful is SBF in Predicting in vivo Bone Bioactivity? **Biomaterials**, v.27, p.2907-15, 2006.

KONISHI, T. et al. Injectable chelate-setting hydroxyapatite cement prepared by using chitosan solution: Fabrication, material properties, biocompatibility, and osteoconductivity. **J Biom Appl**, v.31, n.10, p.1319-1327, 2017.

KOUTSOPOULOS, S.; DALAS, E. The effect of acidic amino acids on hydroxyapatite crystallization. **J Crystal Growth**, v.217, n.4, p.410-415, 2000.

KRUSE, C. R. et al. The effect of pH on cell viability, cell migration, cell proliferation, wound closure, and wound reepithelialization: In vitro and in vivo study. **Wound Repair Regen**, v.25, n.2, p.260-269, Apr 2017.

KULANTHAIVEL, S. et al. Improving the osteogenic and angiogenic properties of synthetic hydroxyapatite by dual doping of bivalent cobalt and magnesium ion. **Ceram Inter**, p11323-11333, 2015.

LANDI, E. et al. Biomimetic Mg- and Mg,CO₃-substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour. **J Eur Ceram Soc**, v.26,p.2593-2601, 2006.

LANDI, E. et al. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour. **J Mater Sci: Mater Med**, v.19, p.239-247, 2008.

LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; SPRIO, S. Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites. **J Eur Ceram Soc**, v.20, p.2377-2387, 2000.

LAGUTA, I.V.; STAVINSKAYA, O.N.; KUZEMA, P.A.; KAZAKOVA, O.A.; NASEDKIN, D.B. Hybrid materials on the basis of gelatin and hydrophilic-hydrophobic silica. **Prot Met Phys Chem Surf**, v. 53, n. 5, p. 807-811, 2017.

LATOCHA, J.; MICHAŁ WOJASIŃSKI, M.; JURCZAK, K.; GIERLOTKA, K.; SOBIESZUK, P.; CIACH, T. Precipitation of hydroxyapatite nanoparticles in 3D-printed reactors. **Chem Eng Process**, v.133, p.221-233, 2018.

LEE, G.H.; MAKKAR, P.; PAUL, K.; LEE, B. Incorporation of BMP-2 loaded collagen conjugated BCP granules in calcium phosphate cement based injectable bone substitutes for improved bone regeneration. **Mater Sci Eng C, Mater Biol Appl**, v.77, n.7, p.713-724, 2017.

LEI, X.; GAO, J.; XING, F.; ZHANG, Y.; MA, Y.; ZHANG, G. Comparative evaluation of the physicochemical properties of nano-hydroxyapatite/collagen and natural bone ceramic/collagen scaffolds and their osteogenesis-promoting effect on MC3T3-E1 cells. **Regen Biomater**, v.6, n.6, p.361-371, 2019.

LEIDI, M.; DELLERA, F.; MARIOTTI, M.; MAIER, J.A.M. High magnesium inhibits human osteoblast differentiation in vitro. **Magnes Res**, v.24, p.1-6, 2011.

LEGEROS, R.Z. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. **Chem Rev**, v.108, p.4742-4753, 2008.

LEMIRE, J.A.; HARRISON, J.J.; TURNER, R.J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nat Rev**, v.11, p.371-384, 2013.

LETCHEMANAN, K.; SHEN, S.C.; NG W.K. et al. Mechanical properties and antibiotic release characteristics of poly(methyl methacrylate)-based bone cement formulated with mesoporous silica nanoparticles. **J Mech Behav Biomed Mater.**, v.72, p.163-170, 2017.

LI, X. et al. The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation in vivo. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.29, p.969-975, 2009.

LI, Z.; YUBAO, L.; YI, Z.; LAN, W.; JANSEN, J.A. In vitro and in vivo evaluation on the bioactivity of ZnO containing nano-hydroxyapatite/chitosan cement. **J Biomed Mater Res**, v.93A, p.269-279, 2010.

LIN, Y.; ZHUORU, Y.; JIANG, C.; LIANSHI, W. Synthesis, characterization and antibacterial property of strontium half and totally substituted hydroxyapatite nanoparticles. **J Wuhan Univer Technology- Mater Sci Ed**, v.23, n.4, p.475-479, 2008.

LIU, J.; LI, J.; YE, J. Properties and Cytocompatibility of Anti-Washout Calcium Phosphate Cement by Introducing Locust Bean Gum. **J Mater Sci Technol**, v.32, n.10, p.1021-1026, 2016.

LIU, W.; ZHANG, J.; WEISS, P.; TANCRET, F.; BOULER, J.M. The influence of different cellulose ethers on both the handling and mechanical properties of calcium phosphate cements for bone substitution. **Acta Biomater**, v.9, n.3, p.5740-5750, 2013.

LIU, W. et al. Insights into the angiogenic effects of nanomaterials: mechanisms involved and potential applications. **J Nanobiotechnology**, v.18, n.1, n.9, p.1-22, 2020.

LOPES, M.A.; MONTEIRO, F.J.; SANTOS, J.D.; SERRO, A.P.; SARAMAGO, B. Hydrophobicity, surface tension, and zeta potential measurements of glass-reinforced hydroxyapatite composites. **J Biom Mater Res**, v.45, n.4, p.370-375, 1999.

LOWE, B.; HARDY, J.G.; WALSH, L.J. Optimizing Nanohydroxyapatite Nanocomposites for Bone Tissue Engineering. **ACS Omega**, v.5, n.1, p.1-9, 2020.

LOWRY, N.; HAN, Y.; MEENAN, B.J.; BOYD, A.R. Strontium and zinc co-substituted nanophase hydroxyapatite. **Ceram Int**, v.43, p.12070-12078, 2017.

LU, J. et al. Preparation and preliminary cytocompatibility of magnesium doped apatite cement with degradability for bone regeneration. **J Mater Sci Mater Med**, v.22, n.3, p.607-615, 2011.

LU, H.; LI, X.; ZHANG, J.; SHI, H.; ZHU, X.; HE, X. Effects of cordycepin on HepG2 and EA.hy926 cells: Potential antiproliferative, antimetastatic and anti-angiogenic effects on hepatocellular carcinoma. **Oncol Lett.**, v.7, n.5, p.1556-1562, 2014.

LV, T. et al. Novel calcitonin gene-related peptide/chitosan-strontium-calcium phosphate cement: Enhanced proliferation of human umbilical vein endothelial cells in vitro. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.107, n.1, p.19-28, 2019.

MAIER, J.A.M.; BERNARDINI, D.; RAYSSIGUIER, Y.; MAZUR, A. High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro. **Biochim Biophys Acta**, v.1689, p.6-12, 2004.

MAITRA, A. Calcium phosphate nanoparticles: second-generation nonviral vectors in gene therapy. **Expert Rev Mol Diagn**, v.5, n.6, p.893-905, 2005.

MARADZE, D.; MUSSON, D.; ZHENG, Y.; CORNISH, J.; LEWIS, M.; LIU, Y. High Magnesium Corrosion Rate has an Effect on Osteoclast and Mesenchymal Stem Cell Role During Bone Remodelling. **Sci Rep**, v. 8, p.1003, 2018.

MASAEI, R. et al. Efficacy of the biomaterials 3wt%-nanostrontium-hydroxyapatite-enhanced calcium phosphate cement (nanoSr-CPC) and nanoSr-CPC-incorporated simvastatin loaded poly(lactic-co-glycolic-acid) microspheres in osteogenesis improvement: An explorative multi-phase experimental in vitro/vivo study. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.69, p.171-83, 2016.

MISRA, D.N.; BOWEN, R.L.; MATTAMAL, G.J. Surface area of dental enamel, bone, and hydroxyapatite: Chemisorption from solution. **Calcif Tissue Res**, v.26, n.1, p.139-142, 1978.

MOCCIA, F.; NEGRI, S.; SHEKHA, M.; FARIS, P.; GUERRA, G. Endothelial Ca^{2+} Signaling, Angiogenesis and Vasculogenesis : just What It Takes to Make a Blood Vessel. **Int J Mol Sci**, v.20, n.16, p.3962, 2019.

MONTUFAR, E.B. et al. Self-hardening calcium deficient hydroxyapatite/gelatine foams for bone regeneration. **J Mater Sci Mater Med**, v.21, p.863-869, 2010.

MORALEDA, B.; SAN ROMAN, J.; RODRIGUEZ-LORENZO, L. Influence of surface features of hydroxyapatite on the adsorption of proteins relevant to bone regeneration. **J Biomater Res A**, v.101, 2013.

NAKAMURA, M.; NAGAI, A.; YAMASHITA, K. Improved wettability increases osteoblastic adhesion on hydroxyapatite. **Phosphorus Res Bull**, v.25, p.28-32, 2011.

NETO, C.; GIACOMETTI, J.A.; JOB, A.E.; FERREIRA, F.C.; FONSECA, J.L.C.; PEREIRA, M.R. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. **Carbohydr Polym**, v.62, p.97-103, 2005.

O'CONNOR, J.P.; KANJILAL, D.; TEITELBAUM, M.; LIN, S.S.; COTTRELL, J.A. Zinc as a Therapeutic Agent in Bone Regeneration. **Materials**, v.13, n.10, p.2211, 2020.

O'DONNELL, M.D.; FREDHOLM, Y.; ROUFFIGNAC, A.; HILL, R.G. Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites. **Acta Biomater**, v.4, p.1455-1464, 2008.

OKADA, M.; MATSUMOTO, T. Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications. **Jpn Den Sci Rev**, v.51, p.85-95, 2015.

OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise Térmica Aplicada a Fármacos e Formulações Farmacêuticas na Indústria Farmacêutica. **Quim Nova**, v.34, n.7, p.1224-1230, 2011.

O'NEILL, E.; AWALE, E.; DANESHMANDI, L.; UMERAH, O.; KEVIN, LO, W.H. The roles of ions on bone regeneration. **Drug Discovery Today**, v.23, n.4, 2018.

PADILLA, S.; IZQUIERDO-BARBA, I.; VALLET-REGÍ, M. High Specific Surface Area in Nanometric Carbonated Hydroxyapatite. **Chem Mater**, v.20, 2008.

PITZ H.S. et al. In Vitro Evaluation of the Antioxidant Activity and Wound Healing Properties of Jaboticaba (*Plinia peruviana*) Fruit Peel Hydroalcoholic Extract. **Oxid Med Cell Longev**, v.2016, p.3403586, 2016.

PREDOI, D., ICONARU, S.L., PREDOI, M.V., George E. STAN, G.E., BUTON, N. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Magnesium-Doped Hydroxyapatite Suspensions. **Nanomaterials**, v.9, n.9, 2019.

QI, X. et al. Development and characterization of an injectable cement of nano calcium-deficient hydroxyapatite/multi(amino acid) copolymer/calcium sulfate hemihydrate for bone repair. **Inter J Nanomedicine**, v.8, p.4441-4452, 2013.

RAMESH, N.; MORATTI, S.C.; DIAS, G.J. Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. **J Biomed Mater Res Part B**, v.00B, p.000–000, 2017.

RAMIREZ-AGUDELO, R. et al. Hybrid nanofibers based on polycaprolactone/gelatin/hydroxyapatite nanoparticles-loaded Doxycycline: Effective anti-tumoral and antibacterial activity. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.83, p.25-34, 2018.

RATNAYAKE, J.T.B.; MUCALO, M.; DIAS, G.J. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. **J Biomed Mater Res Part B**, v.00B, p.1-15, 2016.

REN, F.; XIN, R.; GE, X.; LENG, Y. Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites. **Acta Biomater**, v.5, p.3141-3149, 2009.

RIBEIRO, N.; SOUSA, S.R.; MONTEIRO, F.J. Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology. **J Colloid Interface Sci**, v.351, n.2, p.398-406, 2010.

SAIDAK, Z.; MARIE, P.J. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. **Pharmacol Ther**, v.136, p.216-226, 2012.

SAYYAR, S. et al. Processable conducting graphene/chitosan hydrogels for tissue engineering. **J Mater Chem B**, v.3, n.3, p.481-490, 2015.

SHEPHERD, J.H.; SHEPHERD, D.V.; BEST, S.M. Substituted hydroxyapatites for bone repair. **J Mater Sci: Mater Med**, v.23, p.2335-2347, 2012.

SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSHAW, A. Chitosan functional properties. **Glycoconj J**, v.14, n.4, p.535-542, 1997.

SHI, Z.; NEOH, K.G.; KANG, E.T.; WANG, W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v.27, p.2440-2449, 2006.

SIEK, D. et al. Evaluation of antibacterial activity and cytocompatibility of α -TCP based bone cements with silver-doped hydroxyapatite and CaCO₃. **Ceram Int**, v.43, n.16, p.13997-14007, 2017.

SILVA, L. M. et al. Counterions present in syntheses induce the precipitation of two different populations of Sr-containing hydroxyapatite crystals. **Ceram Int**, v.46, n.4, p.4502-4510, 2020.

SINGH, Y. P.; DASGUPTA, S.; BHASKAR, R. Preparation, characterization and bioactivities of nano anhydrous calcium phosphate added gelatin-chitosan scaffolds for bone tissue engineering. **J Biomater Sci Polym Ed**, v.30, n.18, p.1756-1778, 2019.

SINGH, J.; SINGH, H.; BATRA, U. Magnesium Doped Hydroxyapatite: Synthesis, Characterization and Bioactivity Evaluation. **Biomater Sci: Process, Propert, Appli V: Ceram Trans**, v.254, p.161-174, 2015.

SKWAREK, E.; JANUSZ, W.; STERNIK, D. The influence of the hydroxyapatite synthesis method on the electrochemical, surface and adsorption properties of hydroxyapatite. **Adsorpt Sci Technol**, v.35, n.5-6, p.507-518, 2017.

SZAŁAJ, U. et al.; ŚWIDERSKA-ŚRODA, A.; CHODARA, A.; GIERLOTKA, S.; ŁOJKOWSKI, W. Nanoparticle Size Effect on Water Vapour Adsorption by Hydroxyapatite. **Nanomaterials**, v.9, n.7, p.1005, 2019.

ŚLÓŠARCZYK, A.; CZECHOWSKA, J.; PASZKIEWICZ, Z.; ZIMA, A. New bone implant material with calcium sulfate and Ti modified hydroxyapatite. **J Achiev Mater Manufac Eng**, v.43, n.1, p.170-177, 2010.

SONG, Y. et al. Zinc Silicate/Nano-Hydroxyapatite/Collagen Scaffolds Promote Angiogenesis and Bone Regeneration via the p38 MAPK Pathway in Activated Monocytes. **ACS Appl Mater Inter**, v.12, n.14, p.16058-16075, 2020.

STIPNIECEA, L. et al. Characterization of Mg-substituted hydroxyapatite synthesized by wet chemical method. **Ceram Int**, v.40, p.3261-3267, 2014.

SUKHODUB, L.; SUKHODUB, L.; CHORNA, I. Chitosan-apatite composites: Synthesis and properties. **Biopolymers and Cell**, v.32, p.83-97, 2016.

ŠUPOVÁ, M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. **Ceram Int**, v.41, p.9203-9231, 2015.

SURMENEV, R. A.; SURMENEVA, M. A.; IVANOVA, A. A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis – A review. **Acta Biomater**, v.10, n.2, p.557-579, 2014.

TAHA, A.; AKRAM, M.; JAWAD, Z.; ALSHEMARY, A.Z.; HUSSAIN, R. Strontium doped injectable bone cement for potential drug delivery applications. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.80, p.93-101, 2017.

TAN, Y.; DAVIS, J.A.; FUJIKAWA, K.; GANESH, N.V.; DEMCHENKO, A.V.; STINE, K.J. Surface area and pore size characteristics of nanoporous gold subjected to thermal, mechanical, or surface modification studied using gas adsorption isotherms, cyclic voltammetry, thermogravimetric analysis, and scanning electron microscopy. **J Mater Chem**, v.22, p.6733-6745, 2012.

TAS, A.C.; ALDINGER, F. Formation of apatitic calcium phosphates in a Na-K-phosphate solution of pH 7.4. **J. Mater Sci Mater Med**, v.1, n.6, p.167-174, 2005.

TERRA, J. et al. The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. **Phys Chem Chem Phys**, v.11, p.568-577, 2009.

THOMMES, M. et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure Appl Chem**, v.87, p.1051-1069, 2015.

UNUMA, H.; MATSUSHIMA, Y. Preparation of calcium phosphate cement with an improved setting behavior. **J Asian Ceram Soc**, v.1, P.26-29, 2013.

USKOKOVIC, V.; USKOKOVIC, D.P. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. **J Biomater Res B: Appl Biom**, v.96, n.1, p.152-191, 2011.

WANG, X.; MA, J.; WANG, Y.; HE, B. Bone repair in radii and tibiae of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. **Biomaterials**, v.23, p.4167-4176, 2002.

WEBSTER, T.F.; ERGUN, C.; DOREMUS, R.H.; SIEGEL, R.W.; BIZIOS, R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. **Biomaterials**, v.21, p.1803-1810, 2000.

WU, F.; WEI, J.; GUO, H.; CHEN, F.; HONG, H.; LIU, C. Self-setting bioactive calcium-magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. **Acta Biomater**, v.4, n.6, p.1873-84, 2008.

XIAO, S.; WANG, M.; WANG, L.; ZHU, Y. Environment-Friendly Synthesis of Trace Element Zn, Sr, and F Codoping Hydroxyapatite with Non-cytotoxicity and Improved Osteoblast Proliferation and Differentiation. **Biol Trace Elem Res**, v.185, p.148-161, 2018.

XUE, W.; DAHLQUIST, K.; BANERJEE, A.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, A. Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants. **J Mater Sci: Mater Med**, v.19, p.2669-2677, 2008.

YAMAGUCHI, M.; WEITZMANN, M.N. Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- κ B activation. **Mol Cell Biochem**, v.355, p.179-186, 2011.

YANG, F. et al. Strontium Enhances Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and In Vivo Bone Formation by Activating Wnt/Catenin Signaling. **Stem Cells**, v.29, p.981-991, 2011.

YE, J.; CHEN, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; SHEN, Q. Turning the chitosan surface from hydrophilic to hydrophobic by layer-by-layer electro-assembly. **RSC Adv**, v.4, p.58200-58203, 2014.

YU, W.L. et al. Enhanced osteogenesis and angiogenesis by mesoporous hydroxyapatite microspheres-derived simvastatin sustained release system for superior bone regeneration. **Sci Rep**, v.7, p.44129, 2017.

ZHAO, L. et al. The osteogenic activity of strontium loaded titania nanotube arrays on titanium substrates. **Biomaterials**, v.34, p.19-29, 2013.

ZHANG, Z. et al. Acidic pH environment induces autophagy in osteoblasts. **Sci Rep**, v.7, p.46161, 2017.

ZHANG, J.; SHI, H.S.; LIU, J.Q.; YU, T.; SHEN, Z.H.; YE, J.D. Good hydration and cell-biological performances of superparamagnetic calcium phosphate cement with concentration-dependent osteogenesis and angiogenesis induced by ferric iron. **J Mater Chem B**, v.3, n.45, p.8782-8795, 2015.

ZHANG, L.; WEBSTER, T.J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. **Nano Today**, v.4, n.1, p.66-80, 2009.

ZIMA, A.; PASZKIEWICZ, Z.; SIEK, D.; CZECHOWSKA, J.; SLOSARCZYK, A. Study on the new bone cement based on calcium sulfate and Mg, CO₃ doped hydroxyapatite. **Ceram Int**, v.38, p.4935-4942, 2012.

ZHOU, H.; WU, T.; DONG, X.; WANG, Q.; SHEN, J. Adsorption mechanism of BMP-7 on hydroxyapatite (001) surfaces. **Biochem Biophys Res Commun**, v.361, n.1, p.91-96, 2007.

ZHOU, Z.Q.; YE, D.P.; LIANG, W.G.; WANG, B.; ZHU, Z.Z. Preparation and characterization of a novel injectable strontium-containing calcium phosphate cement with collagen. **Chin J Traumatol**, v.18, n.1, p.33-38, 2015.

ZHU, H.; GUO, D.; QI, W.; XU, K. Development of Sr-incorporated biphasic calcium phosphate bone cement. **Biomed Mater**, v.12, n.1, p.015016, 2017.

ZHU, D.; SU, Y.; ZHENG, Y.; FU, B.; TANG, L.; QIN, Y.X. Zinc regulates vascular endothelial cell activity through zinc-sensing receptor ZnR/GPR39. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.314, n.4, p.404-414, 2018.