

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

RICHARD ALFONSO FILLS CERCHAR

**REGENERAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS ALVEOLARES USANDO UM
CIMENTO ODONTOLÓGICO BIOATIVO CONTENDO NANO-HIDROXIAPATITA,
QUITOSANA, ÓXIDO DE ZINCO NANOPARTICULADO E DOXICICLINA *IN VIVO***

Belo Horizonte
2020

Richard Alfonso Fills Cerchar

**REGENERAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS ALVEOLARES USANDO UM
CIMENTO ODONTOLÓGICO BIOATIVO CONTENDO NANO-HIDROXIAPATITA,
QUITOSANA, ÓXIDO DE ZINCO NANOPARTICULADO E DOXICICLINA *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia - área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés Segura

Belo Horizonte
2020

Ficha Catalográfica

C412r Cerchar, Richard Alfonso Fills.
2020 Regeneração óssea de defeitos alveolares usando um
T cimento odontológico bioativo contendo nano-hidroxiapatita,
quitosana, óxido de zinco nanoparticulado e doxiciclina in
vivo / Richard Alfonso Fills Cerchar. -- 2020.

102 f. : il.

Orientadora: Maria Esperanza Cortés Segura.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Regeneração óssea. 2. Durapatita. 3. Óxido de zinco.
4. Quitosana. 5. Doxiciclina. I. Cortés Segura, Maria
Esperanza. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047

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

Biblioteca Faculdade de Odontologia - FAO UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

REGENERAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS ALVEOLARES USANDO UM CIMENTO ODONTOLÓGICO BIOATIVO CONTENDO NANO-HIDROXIAPATITA, QUITOSANA, ÓXIDO DE ZINCO NANOPARTICULADO E DOXICICLINA in vivo

RICHARD ALFONSO FILLS CERCHAR

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

Aprovada em 15 de outubro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

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

Prof(a). Célia Regina Moreira Lanza
UFMG

Prof(a). Warley Luciano Fonseca Tavares
UFMG

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

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

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais Richard Fills Rojano e Dora Cerchar, e meu filho Thomas Fills.

AGRADECIMENTO

A Deus pela Vida, por ter me dado a oportunidade de viver esta grande experiência, pela força que me concedeu dia a dia para caminhar neste mestrado.

A meus pais que lutaram a vida toda para que seus filhos pudessem estudar e ter uma vida melhor, que me apoiaram e orientaram nas minhas escolhas, obrigado a vocês pelo amor e pela dedicação incondicional. Ao meu filho Thomas Fills, pela paciência, força, carinho e tanto amor que ele me dá, mesmo de longe.

À minha família na Colômbia que tanto incentivaram o meu crescimento profissional e por me ajudar a superar os obstáculos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés e ao Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra, que me acolheram como um filho e por seu constante apoio pessoal, acadêmico e profissional. Ainda agradeço pela constante presença e liderança. Por estarem sempre presentes nos experimentos e em todos momentos que precisei, pela dedicação, amizade e paciência para me ensinar. Pela oportunidade de aprender com a senhora ensinamentos científicos e da vida.

À Profa. Dra. Karina Texeira pela constante ajuda e co-orientação, presença e liderança. Seus conselhos foram muito importantes durante tudo o mestrado. Pela paciência na hora de me corrigir, a oportunidade de aprender e transmitir seus conhecimentos.

A meus amigos do laboratório de Microbiologia e Biomateriais Bruno Bahia Lopez e Giseli Torquato, Alexa Magalhães por seu constante apoio, acadêmico e profissional além da sua confiança e generosidade. Aos alunos de iniciação científica Pedro Henrique Passos e Daniel Agyemang Azare que me ajudaram durante a execução da parte laboratorial e experimental.

Ao Professor Leonardo Lanza, por toda ajuda com o experimento.

A meus amigos da Colômbia Wilmer Diaz, Alejandra Drada, Luis Pedraza pela motivação, as palavras sinceras e alegrias que sempre ajudaram a matar a saudade de casa.

Aos colegas e amigos da área de Clínica Odontológicas Natalia Gomes, Natalia Branco, Elbert Sampaio, Daniel Dutra, Leonardo Franchini, Patricia Reis, Henrique França.

Aos funcionários do Biotério Central da UFMG.

À doutoranda Larissa Souza, prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati da Faculdade de Farmácia/UFMG pela disposição e ajuda durante os procedimentos experimentais e cuidado com os animais.

Ao Prof. Dr. Germán Arturo Bohórquez Mahecha pela sua colaboração com a metodologia para descalcificação rápida das amostras e interpretação das lâminas histológicas.

Aos funcionários Dani, Mara Quintanela Maia e Domenico Romani, do Departamento de Histopatologia da FOUFGM pelo preparo das lâminas histológicas.

Ao Eduardo (CAPI-ICB) pela ajuda e o excelente trabalho para com a aquisição das imagens das lâminas escaneadas.

Ao colegiado de Pós-Graduação Coordenado pela Profa. Dra. Isabela Almeida Pordeus, ao Prof. Dr. Mauro Henrique Abreu e ao Departamento de Odontologia Restauradora/UFMG.

Aos docentes de clínica odontológica em especial aos Prof. Dr. Allyson Nogueira e Profa. Dra. Cláudia Magalhães por sua ajuda no meu crescimento científico

A todos os colegas do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais (LEMB) em especial para Ana Delia Pinzón, Amanda Silva, pela ajuda durante os meus experimentos de síntese.

Aos Professores do Curso de Atualização e Aperfeiçoamento em Cirurgia Oral Carlos Eduardo Assis Dutra, Sergio Monteiro Lima Junior, João Marcelo como também Rose e Grazi pela aprendizagem e por me acolher como estagiário no curso.

Finalmente agradeço à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e à Organização de Estados Americanos (OEA) pelo programa de bolsas de estudo PAEC OEA-GCUB

A todos aqueles que não foram citados, mas contribuíram de alguma forma deste momento em minha vida o meu muito obrigado.

Naquele tempo... "Disse-lhe, então, Jesus: "Ó mulher, grande é tua fé! Seja-te feito como desejas". E na mesma hora sua filha ficou curada."

São Mateus, 15 21– 28.

RESUMO

A reabilitação oral dos pacientes pode ser afetada pela pouca quantidade de tecido ósseo presente em cavidade oral. As perdas ósseas estão associadas às exodontias, doenças periodontais, infecções, trauma e doenças congênitas. Visando alcançar características ideais para o ganho e/ou recuperação do tecido ósseo perdido cimentos ósseos estão sendo usados no tratamento dessas lesões devido às suas propriedades de biocompatibilidade e osteocondução contribuindo para a recuperação estética e funcional dos pacientes. Este estudo teve como objetivo pesquisar os efeitos da aplicação de um novo cimento odontológico contendo nano-hidroxiapatita, óxido de zinco nanoparticulado, quitosana, com doxiciclina (DHCZ) e sem doxiciclina (HCZ) na regeneração óssea de defeitos alveolares. Utilizaram-se quarenta ratos *Wistar* machos com 6 semanas de vida, pesando em média 175 gramas. Um Defeito ósseo alveolar foi confeccionado após exodontia do primeiro molar superior esquerdo, foram preenchidos aleatoriamente em quatro grupos: G1: cimento DHCZ, G2: cimento HCZ, G3: matriz óssea desmineralizada bovina (MODB) e G4: controle-coágulo sanguíneo. Ao final de cada tempo experimental, 14 dias (T1) e 28 dias (T2) os animais foram eutanasiados e as maxilas dissecadas foram mantidas em formol 10% por 48 horas. Após descalcificação os tecidos foram submetidos à avaliação histológica com coloração de Hematoxilina/Eosina (HE) e tricrômica de Masson para então passar por análise histomorfométrica. Histologicamente foram observadas diferenças em relação à degradação do biomaterial sendo maior no cimento DHCZ. As trabéculas ósseas neoformadas estiveram presentes em todos os grupos, mas a quantidade e tamanho dos espaços medulares e a quantidade de vasos sanguíneos presentes neles variaram entre os grupos. Osteócitos foram observados dispersos na matriz óssea dentro de lacunas de menor tamanho no T2 em relação ao T1, em todos os grupos, além da matriz óssea estar mais organizada. A presença de fibras colágenas foi verificada na coloração tricrômica de Masson em todos os grupos. As análises histomorfométricas mostraram que todos os grupos preenchidos com biomaterial tiveram neoformação óssea acima de 37%, sendo maior no grupo preenchido com DHCZ (55%). No T2 os grupos preenchidos com biomaterial apresentaram preenchimento acima de 67%, sendo maior no MODB (80%), porém os resultados do grupo DHCZ tiveram uma resposta similar (77%). Os dados da histomorfometria foram submetidos ao teste estatístico não-paramétrico Kruskal Wallis com nível de significância de ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que quando se compara o cimento ósseo DHCZ no T1 com todos os grupos do T2 não houve diferença estatística significativa indicando que foi preciso menos tempo para atingir o mesmo nível alcançado no T2 por todos os grupos. Com base nos resultados obtidos é possível concluir que o cimento odontológico contendo doxiciclina, proposto no presente estudo, promoveu uma excelente resposta na regeneração do defeito alveolar em ratos com em relação à área do preenchimento nos primeiros 14 dias sendo significativamente maior.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Cimentos ósseos. Hidroxiapatita. Óxido de zinco. Quitosana. Doxiciclina.

ABSTRACT

Oral rehabilitation of patients can be affected by the small amount of bone tissue present in the oral cavity. Bone loss is associated with tooth extractions, periodontal diseases, infections, trauma and congenital diseases. In order to achieve ideal characteristics for the gain and / or recovery of lost bone tissue, bone cements are being used in the treatment of these injuries due to their biocompatibility and osteoconduction properties, contributing to the patients' aesthetic and functional recovery. This study aimed to research the effects of the application of a new dental cement containing nano-hydroxyapatite, nanoparticulate zinc oxide, chitosan, with doxycycline (DHCZ) and without doxycycline (HCZ) on bone regeneration of alveolar defects. Forty six-week-old male Wistar rats, weighing an average of 175 grams, were used. An alveolar bone defect was made after extraction of the left upper first molar, and were randomly filled in four groups: G1: DHCZ cement, G2: HCZ cement, G3: bovine demineralized bone matrix (MODB) and G4: blood clot control. At the end of each experimental time, 14 days (T1) and 28 days (T2) the animals were euthanized and the dissected jaws were kept in 10% formaldehyde for 48 hours. After descaling, the tissues were subjected to histological evaluation with Hematoxylin / Eosin (HE) staining and Masson's trichrome staining and histomorphometric analyzes. Histologically, differences were observed in relation to the degradation of the biomaterial, being greater in DHCZ cement. Newly formed bone trabeculae were present in all groups, but the number and size of the medullary spaces and the number of blood vessels present in them varied between groups. Osteocytes were observed dispersed in the bone matrix within smaller gaps in T2 than in T1 in all groups, and the bone matrix was more organized. The presence of collagen fibers was verified in Masson's trichrome staining in all groups. Histomorphometric analyzes showed that all groups filled with biomaterial had new bone formation above 37%, being higher in the group filled with DHCZ (55%). In T2, the groups filled with biomaterial had a fill above 67%, being higher in MODB (80%), however the results of the DHCZ group had a similar response 77%. Histomorphometric data were submitted to the Kruskal Wallis non-parametric statistical test with a level of significance of ($p < 0.05$). The results showed that when comparing the DHCZ bone cement in T1 with all groups in T2 there was no statistically significant difference indicating that it took less time to reach the same level reached in T2 by all groups. Based on the results obtained, it is possible to conclude that the dental cement containing doxycycline, proposed in the present study, promoted an excellent response in the regeneration of the alveolar defect in rats with respect to the area of filling in the first 14 days being significantly larger.

Keywords: Bone regeneration. Bone cements. Hydroxyapatite. Zinc oxide. Chitosan. Doxycycline.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura hierárquica do osso.....	18
Figura 2 - Células ósseas	20
Figura 3 - Processo de cicatrização de defeitos ósseos ou falhas	22
Figura 4 - Representação da estrutura de hidroxiapatita.....	28
Figura 5 - Estrutura química da quitosana.....	33
Figura 6 - Fotografias do defeito cirúrgico em região alveolar mostrando as etapas da técnica cirúrgica.....	46
Figura 7 - Fotografia ilustrativa demarcando área total selecionada (AT)	49
Figura 8 - Difractometria de raios X da HA em pó.....	51
Figura 9 - Difractometria de raios X do ZnO em pó.....	52
Figura 10 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar no tempo de 14 dias.....	54
Figura 11 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar no tempo de 28 dias.....	56
Figura 12 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com DHCZ por coloração HE.....	57
Figura 13 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com DHCZ por coloração tricrômica de Masson.....	58
Figura 14 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com cimento sem doxiciclina HCZ por coloração HE.....	59
Figura 15 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com cimento sem doxiciclina HCZ por coloração tricrômica de Masson	60
Figura 16 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 14 dias sem tratamento (coágulo) por coloração HE.....	61
Figura 17 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 14 dias sem tratamento (coágulo), por coloração tricrômica de Masson	62
Figura 18 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com MODB, por coloração HE.....	63

Figura 19 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com MODB, por coloração tricrômica de Masson.....	64
Figura 20 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com DHCZ com a coloração HE.....	65
Figura 21 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com DHCZ por coloração tricrômica de Masson.....	66
Figura 22 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com cimento sem doxiciclina HCZ por coloração HE.....	67
Figura 23 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com cimento sem doxiciclina HCZ por coloração tricrômica de Masson	68
Figura 24 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 28 dias, sem tratamento (coágulo) por coloração HE.....	69
Figura 25 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 28 dias sem tratamento (coágulo), por coloração tricrômica de Masson	70
Figura 26 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com MODB, com a coloração HE.....	71
Figura 27 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com MODB, na coloração tricrômica de Masson.....	72
Figura 28 - Boxplot dos valores da área óssea trabéculas neoformadas da porcentagem nos diferentes grupos.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do tecido ósseo.....	19
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos enxertos ósseos	23
Tabela 3 - Biomateriais e sua aplicação para regeneração óssea.....	26
Tabela 4 - Lista de compostos de fosfato de cálcio.....	27
Tabela 5 - Vantagens e desvantagens do uso de cimentos de fosfato de cálcio.....	37
Tabela 6 - Distribuição dos grupos e animais.....	45
Tabela 7 - Mensuração da neoformação por grupo no tempo de 14 dias.....	73
Tabela 8 - Mensuração da neoformação por grupo no tempo de 28 dias.....	74
Tabela 9 - Análises estatística comparando os grupos dentro do mesmo tempo experimental.....	75
Tabela 10 - Análises estatística comparando um grupo entre os tempos 1 e 2	75
Tabela 11 - Análises estatística comparando diferentes grupos entre os tempos 1 e 2	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão De Ética no Uso Animal
CaP	Fosfato de Cálcio
CPC	Cimentos de Fosfato De Cálcio
°C	Graus Centígrados
MODB	Matriz Óssea Desmineralizada Bovina
g	Gramas
Dx	Doxiciclina
DHCZ	Cimento à Base de Quitosana, Nano-Hidroxiapatita, Nanopartículas de Óxido de Zinco Com Doxiciclina
HCZ	Cimento à Base de Quitosana, Nano-Hidroxiapatita, Nanopartículas de Óxido de Zinco Sem Doxiciclina
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina/Eosina
LEMB	Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais
mg/kg	Miligrama por Quilograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro Quadrado
µm	Micrômetro
MMPs	Metaloproteinases da Matriz
pH	Potencial Hidrogeniônico
P	Valor-P
PEG	Polietilenoglicol
DRx	Difratometria de Raios X
UV	Ultravioleta
ZnO	Óxido de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Tecido ósseo	18
2.1.1	Matriz óssea extracelular	19
2.1.2	Células do tecido ósseo	20
2.1.3	Processo de remodelação óssea	21
2.2	Enxertos ósseos	22
2.2.1	Propriedades dos enxertos ósseos	22
2.2.2	Classificação dos enxertos ósseos	24
2.3.	Biomateriais para regeneração óssea	25
2.3.1	Biocerâmicas	25
2.3.1.1	Fosfato de cálcio	26
2.3.1.2	Hidroxiapatita	27
2.3.1.3	Nano-Hidroxiapatita	29
2.4	Óxido de zinco Nanoparticulado	30
2.5	Polímeros	31
2.5.1	Quitosana	32
2.6	Doxiciclina	33
2.7	Cimentos osseos	36
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	METODOLOGIA	40
4.1	Síntese dos materiais de partida	40
4.1.1	Síntese de Hidroxiapatita nanoparticulada	40
4.1.2	Síntese de óxido de Zinco nanoparticulado	41
4.2	Difração de raios-X	41

4.3	Preparação dos cimentos	42
4.4	Esterilização dos materiais de partida e dos cimentos	42
4.5	Amostragem	43
4.6	Aspectos éticos	44
4.7	Distribuições dos animais nos grupos de experimentação	44
4.8	Cirurgia	47
4.9	Preparação das amostras histológicas	47
4.9.1	Coloração de Hematoxilina/Eosina	47
4.9.2	Coloração tricrômica de Masson	48
4.10	Análises dos resultados	48
4.10.1	Descrição histológica	48
4.10.2	Análise histomorfométrica	48
4.11	Análise estatística	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Difratometria de raios X da Hidroxiapatita	51
5.2	Difratometria de raios X do Óxido de zinco	52
5.3	Avaliação histológica	52
5.3.1	Aspectos gerais	52
5.4	Análise histomorfométrica	72
6	DISCUSSÃO	76
7	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	84
	ANEXO A	97
	ANEXO B	98

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a reabilitação oral dos pacientes apresenta grandes desafios, a perda do volume ósseo e os defeitos ósseos alveolares são os principais obstáculos para o sucesso clínico. Essas alterações ósseas podem resultar de trauma, infecção, fratura dentária, doença periodontal severa, ressecção de tumor, cisto, malformações adquiridas ou congênitas caracterizadas pelo comprometimento da quantidade e qualidade óssea (YAMADA e EGUSA, 2018; WAN *et al.*, 2006).

Para alcançar o sucesso funcional e estético são necessários procedimentos que restaurarem o volume ósseo em quantidade (termos de espessura e comprimento) e gerem qualidade óssea aceitável. Alguns procedimentos utilizados são: enxertos onlay, enxertos inlay, expansão óssea, regeneração óssea guiada e distração osteogênica alveolar. A maioria das técnicas requer o uso de enxertos autógenos ou outros tipos de substitutos ósseos, xenógenos, alógenos ou enxertos aloplásticos (REININGER *et al.*, 2016).

Mais de dois milhões de procedimentos de enxerto ósseos são realizados no mundo anualmente Wang *et al.* (2017), colocando-os na segunda posição dos materiais mais comumente usados para transplante atrás do sangue (BALDWIN *et al.*, 2019). O enxerto ósseo autógeno é considerado o “padrão ouro” no tratamento de fraturas, porém, apresenta desvantagens, incluindo morbidade do local doador e quantidade limitada de enxerto disponível para obtenção, embora ainda não seja uma opção ideal para determinados indivíduos (WANG *et al.*, 2017).

No entanto, outros enxertos como os alógenos, podem desencadear uma resposta imune exacerbada, transmitir doenças e ter um risco significativo de infecções, do mesmo modo os enxertos xenógenos apresentam uma antigenicidade significativamente maior do que a dos alógenos (CALABRESE *et al.*, 2016; SHIBUYA e JUPITER, 2015). Para superar essas limitações os enxertos aloplásticos representam uma alternativa viável comparados a outros enxertos ósseos porque permitem superar suas deficiências, diminuindo a morbidade do paciente, evitando tempo cirúrgicos prolongados e uma segunda cirurgia, ausência de risco de transmissão de material viral ou genético, além disso encontra-se amplamente disponível no mercado e ter um custo de produção é comparativamente baixo. Ainda o aumento de seu uso atribui-se

à facilidade de manipulação, adaptação aos defeitos e à baixa imunogenicidade (CABBAD *et al.*, 2019).

Atualmente, enxertos aloplásticos tais como cimento ósseo representam uma alternativa por se encontrar disponíveis comercialmente no mercado e por apresentar evidências clínicas da efetividade (GUO *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2013). Esses cimentos podem variar na composição, no mecanismo de ação e nas características específicas, visando sempre potencializar a resposta biológica e proporcionar suporte na regeneração tecidual Zwingenberger *et al.* (2012), dessa forma tem sido pesquisada a combinação de múltiplos biomateriais para regeneração óssea, como biocerâmicas, tais como fosfatos de cálcio, antibacterianos, polímeros ou proteínas morfogênicas.

No grupo de pesquisa de Sistemas de liberação controlada de fármacos, pesquisas tem sido realizadas e um novo cimento odontológico foi desenvolvido com intuito da utilização na clínica. Nesse cimento à base de quitosana, nano-hidroxiapatita, nanopartículas de óxido de zinco, com (DHCZ) e sem (HCZ) doxiciclina. Foi físico-quimicamente caracterizado e testado para regeneração nervosa em células de linhagem HS-Sch-2 por Torquato (2020), e na Biomineralização dentinária, *in vivo* por De Oliveira (2019), mostrando-se promissor na engenharia de tecido.

Aproximadamente 60% dos enxertos ósseos sintéticos disponíveis no mercado possuem cerâmicas em suas formulações, destacando-se, sulfatos de cálcio, hidroxiapatita, fosfato tricálcico ou combinações dos mesmos (ZWINGENBERGER *et al.*, 2012). A hidroxiapatita sintética apresenta semelhança com a fase mineral do osso, e por consequência tem se mostrado promissora para uso clínico em aplicações na regeneração de tecido ósseo por apresentar biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade junto ao tecido ósseo nativo.

A quitosana é comumente usada em aplicações ortopédicas para fornecer suporte mecânico para regeneração óssea devido às suas características como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, osteoindução e não toxicidade (FANG *et al.*, 2019).

O óxido de zinco (ZnO) tem a capacidade de promover o crescimento ósseo. Porém, seu mecanismo de ação é baseado na indução e aceleração da

regeneração do tecido ósseo, além da prevenção ativa de infecções bacterianas que podem dificultar a cicatrização do tecido (FELICE *et al.*, 2018).

A doxiciclina (Dox) tem sido pesquisada para facilitar a regeneração óssea, por ser um derivado semissintético da tetraciclina, a Dox, mostra efeitos positivos ao estimular a osteogênese, induzir apoptose dos osteoclastos e inibir a reabsorção óssea inflamatória e a osteoclastogênese (LUCATELI *et al.*, 2018).

Contudo, o uso desse cimento como biomaterial na regeneração de defeitos ósseos não tinha sido comprovado. Assim, a relevância técnico-científica do presente estudo é a obtenção de um cimento osteogênico bioativo para ser usado em defeitos alveolares após exodontia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

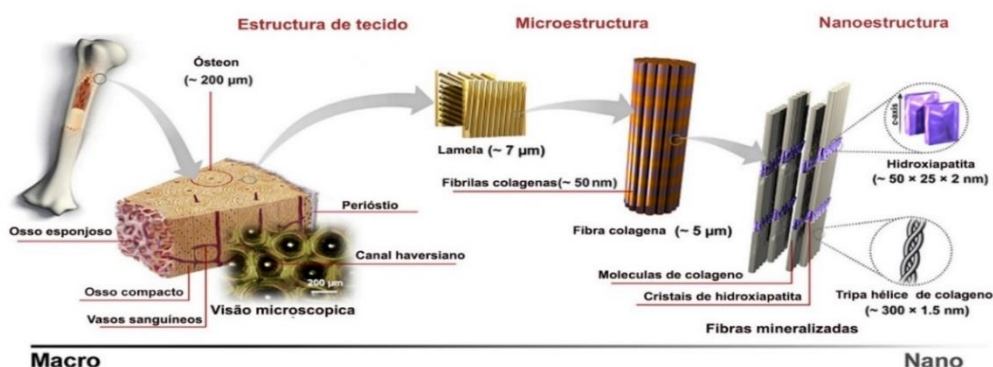
A engenharia de tecidos é uma ciência interdisciplinar que aplica a química, ciência dos materiais, engenharia e medicina, que tem como objetivo reparar os tecidos danificados criando ambientes artificiais temporários, projetados especificamente para facilitar a regeneração e crescimento dos tecidos (ASGHARI *et al.*, 2017).

A crescente demanda por substitutos ósseos tem impulsionado a compreensão da cicatrização óssea, biologia molecular, evolução de tecnologias e avanços em biomateriais com características ideais na regeneração óssea na engenharia de tecidos (KIM *et al.*, 2013).

2.1 O tecido Ósseo

O sistema esquelético tem como unidade básica o osso (FIGURA 1). O osso é um tecido conjuntivo mineralizado que tem funções importantes fornecendo estrutura e suporte ao peso corporal, proteção de órgãos vitais, apoio aos movimentos mecânicos, hospedagem de células hematopoiéticas e manutenção de homeostase do ferro. Este tecido classifica-se como osso cortical ou compacto na sua camada mais externa com menos de 10% do volume de porosidade e osso esponjoso ou trabecular na camada mais interna com uma porosidade de 50–90% do volume, nos quais acontecem diferentes processos biológicos mediados pela interação células ósseas como remodelação dinâmica, maturação, diferenciação e reabsorção (BOSE *et al.*, 2013).

Figura 1- Estrutura hierárquica do osso



Fonte: SADAT-SHOJAI *et al.* (2013). “Adaptado para fins didáticos”

2.1.1 Matriz óssea extracelular

A Matriz óssea extracelular está composta por sais inorgânicos e componentes orgânicos. Os componentes orgânicos dividem-se em proteínas colágenas e não colágenas. Entre as proteínas colágenas, o colágeno tipo 1 é o principal componente da matriz extracelular é secretado pelos osteoblastos, essa matriz colágena é responsável pela resistência à tração. As proteínas ósseas morfogenéticas não colágenas incluem a osteocalcina, osteonectina, osteopontina, e sialoproteína II do osso, e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fibronectina e fatores de crescimento conferem força e elasticidade a toda a matriz (FLORENCIO-SILVA, 2015).

Os cristais de apatita são o principal constituinte inorgânico da matriz extracelular óssea sendo cerca de 60% do peso e 90 % no esmalte, conferindo resistência compressiva nos ossos, com uma disposição em intervalos regulares ao longo das fibrilas colágenas essa associação é responsável pela rigidez e resistência típicas do tecido ósseo (DATTA *et al.*, 2008).

As apatitas biológicas divergem da composição estequiométrica da HA sintética, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e contêm quantidades significativas de componentes produto da substituição iônica, tais como Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , citrato, HPO_4^{2-} , carbonato (CO_3^{2-}), Cl^- , F^- etc. A composição química do osso é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química do osso

Fase inorgânica	Fase orgânica
✓ HÁ	✓ Proteínas não colágenas
✓ H ₂ O	(osteocalcina, osteonectina,
✓ Carbonatos	osteopontina, trombospondina,
✓ Citratos	proteína morfogenética, sialoproteína,
✓ Na ⁺	proteína séricas)
✓ Mg ²⁺	✓ Vestígios: polissacarídeos, lipídios,
✓ Cl	citoquinas
✓ Outros: K ⁺ , F ⁻ , Zn ²⁺ ,	✓ Células ósseas primárias:
Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Sr ²⁺ , Pb ²⁺	osteoblastos, osteócitos, osteoclastos

Fonte: ELIAZ *et al.* (2017). "Adaptado para fins didáticos"

2.1.2 Células do tecido ósseo

As células ósseas se encontram incorporadas na matriz mineralizada e no tecido conjuntivo. O osso possui quatro tipos principais de células: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células do revestimento ósseo (FIGURA 2).

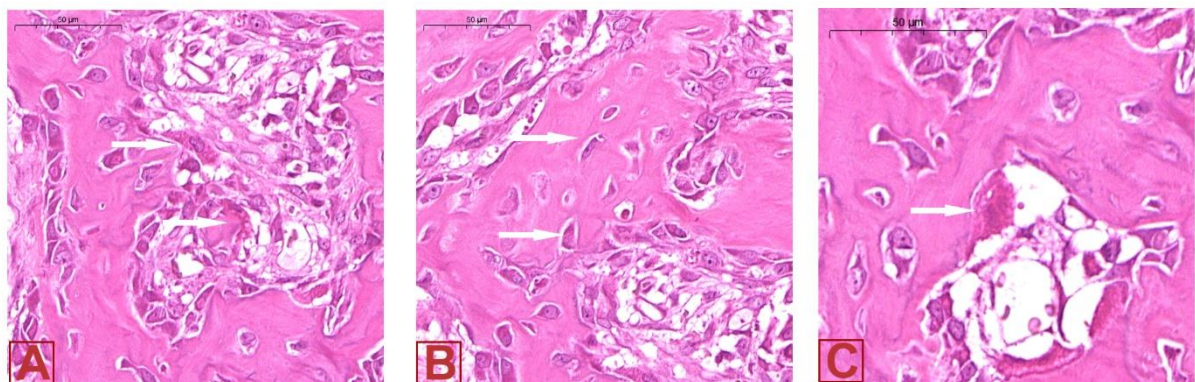
As células do revestimento ósseo são osteoblastos quiescentes de forma plana que cobrem as superfícies ósseas, onde não ocorre reabsorção nem formação óssea.

Osteoblastos são células cuboides que possuem apenas um núcleo e tem função da formação óssea, encontram-se localizados ao longo da superfície óssea. Os osteoblastos se originam da diferenciação de células osteogênicas no tecido que cobre a parte externa do osso o periósteo ou na medula óssea.

Osteócitos são células ósseas maduras, originam-se ao término da atividade de formação do osteoblasto dispersas na matriz óssea mineralizada. Eles estão no interior das lacunas da matriz óssea e atuam como sensores de estresse por mostrar uma morfologia dendrítica, ajudando assim a adaptação do osso às forças mecânicas diárias por tanto compreende 90-95% do total de células ósseas (FLORENCIO-SILVA, 2015).

Osteoclastos são células multinucleadas, grandes, com citoplasma rico em lisossomos, apresenta numerosas mitocôndrias e um complexo de Golgi altamente desenvolvido. Essas células são responsáveis pela reabsorção e remodelação da matriz liberando os minerais e íons essenciais na fabricação do novo tecido ósseo.

Figura 2 - Células ósseas



Legenda: As setas indicam A) osteoblastos B) osteócitos C) osteoclastos
Fonte: próprio autor

2.1.3 Processo de remodelação óssea

Em condições normais o tecido ósseo maduro é mantido por um processo dinâmico de remodelação óssea que inclui estágios de osteogênese e reabsorção (CROCKETT *et al.*, 2011). Esse processo é necessário para a adaptação do esqueleto ao uso mecânico, bem como para a homeostase do cálcio e a cicatrização de fraturas (DALLAS *et al.*, 2013).

Para a osteogênese os osteoblastos sintetizam matriz óssea em duas fases: a primeira chamada deposição da matriz orgânica e a subsequente de mineralização. Na primeira etapa os osteoblastos secretam proteínas colágenas, principalmente colágeno tipo I, e não colágenas além de proteoglicanos os quais formam a matriz orgânica. A segunda etapa acontece em duas fases: fase vesicular, caracterizada pela liberação de vesículas pelos osteoblastos e a incorporação dos íons de cálcio e fosfato dentro das vesículas. Na fase fibrilar a supersaturação dos íons leva à ruptura da vesícula e espalhamento dos cristais de hidroxiapatita (FLORENCIO-SILVA, 2015).

A reabsorção acontece pela secreção de ácidos, como o láctico e o cítrico, que são responsáveis por diminuir o pH, facilitando a dissolução de minerais e de enzimas hidrolíticas, que digerem a matriz extracelular. O desequilíbrio desse processo fortemente acoplado pode causar doenças como a osteoporose (CHEN *et al.*, 2018).

Apesar disso, em caso de perda da integridade óssea, processos distintos entram em ação para o restabelecimento do tecido lesionado. Diante a fratura, não somente existe uma perturbação na integridade esquelética, mas também das estruturas vasculares normais e dos nutrientes que fluem no local da fratura (NYARY *et al.*, 2018).

No local do osso afetado o suprimento sanguíneo determina o tempo de cicatrização, entretanto, fatores como tipo de fratura, idade do paciente, condições patológicas e local anatômico da lesão influenciam o processo de reparo. Neste contexto de regeneração o processo envolve quatro fases: uma fase inflamatória, duas fases de reparo que consistem em formações de calos moles e duros e a fase de remodelação (FIGURA 3) (WUBNEH *et al.*, 2018).

Figura 3 - Processo de cicatrização de defeitos ósseos ou falhas



Legenda: A) Inflamação B) Calo mole C) Calo duro D) Remodelação

Fonte: DRAENERT *et al.*, (2014). "Adaptado para fins didáticos"

A fim de obter sucesso no reparo do tecido ósseo nessas condições, os enxertos devem cumprir com determinadas condições: um ambiente nutritivo com amplo suprimento sanguíneo, presença de um arcabouço tridimensional, disponibilidade de células progenitoras e presença de fatores de crescimento (ROBERTS *et al.*, 2012).

2.2 Enxertos ósseos

Os enxertos ósseos têm sido utilizados por muito tempo para auxiliar nos processos de reparo ósseo. Um enxerto ósseo é usado em um procedimento cirúrgico para substituir o osso ausente por material do próprio corpo do paciente ou um substituto artificial sintético ou natural (KUMAR *et al.*, 2013). Os enxertos ósseos estão classificados em enxerto autógeno, alógeno, xenógeno e aloplásticos. Os enxertos ósseos diferem em termos de suas propriedades de osteogênese, osteocondução, osteoindução, e suporte estrutural (TABELA 2) (FILLINGHAM e JACOBS, 2016).

2.2.1 Propriedades dos enxertos ósseos

Três propriedades são essenciais para regeneração óssea no uso de enxertos: a osteogênese, osteoindução e osteocondução.

A Osteogênese é a capacidade das células osteoprogenitoras derivadas do hospedeiro ou doador de proliferar e diferenciar em osteoblastos e eventualmente em

osteócitos, essas células representam o potencial "osteogênico" do enxerto (ORYAN *et al.*, 2014).

A osteoindução é a estimulação e ativação das células-tronco mesenquimais hospedeiras do tecido circundante que se diferenciam em osteoblastos formadores de ossos, esse processo é mediado por uma cascata de sinais e pelas ativações de vários receptores extras e intracelulares. Esse processo especializado é moderado principalmente por fatores de crescimento, proteínas e interleucinas (DRAENERT *et al.*, 2014). Essas células indiferenciadas têm importância na regeneração uma vez que podem ser recrutadas para formar células osteoprogenitoras e com o tempo, evoluir para células ósseas diferenciadas (ALBREKTSSON *et al.*, 2001).

Osteocondução é a capacidade de um enxerto de fornecer uma superfície que permite o crescimento ósseo de células-tronco mesenquimais, osteoblastos e osteoclastos atuando como andaime, facilitando a orientação dos vasos sanguíneos e a neoformação óssea. Entre os andaimes osteocondutores sintético encontram-se os cimentos de fosfato de cálcio e o sulfato de cálcio (FILLINGHAM e JACOBS, 2016).

Tabela 2- Vantagens e desvantagens dos enxertos ósseos

Propriedades	Autógeno	Alógeno	Xenôgeno	Aloplásticos		
				Hidroxiapatita	Cimento CPC	Fosfato tricálcio
Biocompatibilidade	sim	Não	parcialmente	sim	Sim	Sim
Osteocondução	Sim	Sim	Sim		Sim	Sim
Osteoindução	Sim	sim	não	sim	Não	Não
Osteogênese	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
Cirurgia adicional	Necessária	Desnecessária	Desnecessária	Desnecessária	Desnecessária	Desnecessária
Taxa de reabsorção	variável	variável	variável	Lenta (6 meses até 10 anos)	Muito lenta	Lenta (6-8 meses)
Fonte de obtenção	limitado	Ilimitado	Ilimitado	Ilimitado	Ilimitado	Ilimitado
Morbidade do sitio doador	marcado	não marcado	não marcado	não marcado	não marcado	não marcado
Potencial de transmissão de infecção	não marcado	marcado	marcado	não marcado	não marcado	não marcado
Rejeição	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não

Fonte: KARALASHVILI *et al.* (2018). "Adaptado para fins didáticos"

2.2.2 Classificação dos enxertos ósseos

Os enxertos autógenos são aqueles obtidos do mesmo paciente sendo considerado “padrão ouro” para regeneração óssea, devido ao seu potencial de osteogênese, osteoindução e osteocondução (AZI *et al.*, 2016). As principais desvantagens ao utilizar enxerto autógeno são: o aumento da morbidade podendo provocar dor e/ou hematomas, prolongamento dos tempos operatórios, o local doador tem potencial de infecção, seu uso apresenta limitações em pacientes idosos e pediátricos, resultados estéticos questionáveis, tem disponibilidade enxertos autógeno limitada (DU *et al.*, 2015). As principais áreas doadoras utilizadas são: crista ilíaca, sínfise mandibular e ramo anterior da mandíbula (GARCÍA-GARETA e COATHUP, 2015).

Os enxertos alógenos são enxertos que provém da mesma espécie humana, mas não do mesmo paciente, têm sido utilizados em clínica como uma alternativa comum aos enxertos autógenos (ORYAN *et al.*, 2014). A principal fonte de enxertos alógenos é proveniente de osso de cadáver em bancos de ossos. Dentre as desvantagens estão: resultados clínicos variáveis, resultados limitados com relação ao padrão ouro, capacidade de desencadear resposta imune ou transmitir doenças, apresentar baixo potencial osteogênico e risco significativo de infecções (CALABRESE *et al.*, 2016)

Os enxertos xenógenos são provenientes de uma espécie diferente da humana, pelo qual sua antigenicidade é significativamente maior do que a dos alógenos. Nesse sentido requer um processamento de desproteínização estéril, limitando sua propriedade osteocondutora. Os enxertos xenógenos mais comumente usados são de fonte óssea bovina desproteínizada, outras fontes animais como equino ou suína podem ser utilizadas. (SHIBUYA e JUPITER, 2015). A matriz óssea desmineralizada é conhecida como um material com boa capacidade de osteocondutividade devido à sua estrutura físico-química semelhante ao osso nativo, por isso tem sido comumente utilizada em cirurgia ortopédica (SINDEL *et al.*, 2017).

Os enxertos aloplásticos visam superar as desvantagens do uso de enxertos ósseos autólogos e alógenos (GARCÍA-GARETA e COATHUP, 2015), são biomateriais sintéticos, fabricados de várias formas com propriedades físico-químicas variáveis e podem ser degradáveis e não-degradáveis (SHEIKH *et al.*, 2017).

Os sintéticos baseados em cerâmicas, como os fosfatos de cálcio são mais utilizados devido à sua semelhança química com o mineral ósseo, geralmente apresentam boa biocompatibilidade, osteocondutividade, baixo custo e estão prontamente disponíveis (GARCÍA-GARETA, 2015).

Por sua propriedade osteocondutora alguns estudos sugerem, por exemplo, que a pirofosfatase desempenha um papel fundamental no processo de osteoindução por cerâmica CaP (OTHMAN *et al.*, 2019). Além disso, eles podem ser misturados com aditivos como antibióticos, tornando-os atraentes no cenário de defeitos ósseos associados a infecções.

2.3 Biomateriais para regeneração óssea

Para a regeneração e o reparo ósseo, uma variedade de biomateriais tem sido pesquisada e usada. Há três principais tipos de materiais biodegradáveis amplamente estudados e aplicados clinicamente, biocerâmicas tipo fosfato de cálcio, polímeros biodegradáveis e metais (TABELA 3) (SHEIKH *et al.*, 2015).

2.3.1 Biocerâmicas

As biocerâmicas tipo andaime sintético feitas de fosfato de cálcio sintéticas demonstraram induzir uma resposta biológica semelhante à do osso. As cerâmicas em sua maioria são obtidas por sinterização. No uso da cerâmica a porosidade é determinante para permitir uma maior difusão celular no interior do andaime, o tamanho ideal dos poros encontra-se entre 150 – 500 micrômetros. Uma consideração importante é que, com uma maior porosidade, o enxerto mantém significativamente menor força de compressão (CARSON *et al.*, 2007).

Tabela 3 - Biomateriais e suas aplicações para regeneração óssea

	Material	Aplicações para reparo e regeneração óssea
Fosfatos de cálcio	Hidroxiapatita	Andaimes, compósitos, preenchimentos ósseos (grânulos e blocos), pastas, vertebroplastia, administração de drogas, revestimentos
	TCP	Preenchimentos ósseos, pastas injetáveis, cimentos
	Brushite	Administração de drogas, restauração de defeitos metafisários, âncora ligamentar.
	Monetite	Parafusos de osteossíntese, preservação de crista, aumento ósseo vertical, preenchimento de defeito, vertebroplastia
polímeros	Colágeno	Transportadores (esponjas) para BMP, composto com HA, membranas para regeneração óssea guiada, andaimes
	Quitosana	Andaimes, microgrânulos, materiais compostos, VBA, membranas, xerogéis
	PGA	Fixação interna, material de enxerto, andaime, compósito
	PLA	Fixação de fratura, parafusos de interferência, andaimes, material de enxerto ósseo
	PLGA	Parafusos de interferência, microesferas e suportes para BMP, andaimes, composto
	PCL	Scaffolds e compósitos com cargas HÁ

Legenda: PGA: ácido poliglicólico; PLGA: ácido polilático glicólico; PCL: poli caprolactona; PLA: ácido polilático; BMP: proteínas morfogenéticas ósseas; HA: hidroxiapatita.

Fonte: SHEIKH *et al.* (2015). “Adaptado para fins didáticos”

2.3.1.1 Fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio (CaP) são materiais biomédicos caracterizados por uma composição química, que é semelhante à da fase mineral do tecido ósseo e aos dentes. Da família de compostos de sais de cálcio, os fosfatos de cálcio consistem em proporções variáveis de íons cálcio e organofosfatos (TABELA 4). Os CaP com uma razão atômica Ca/P entre 1,5 e 1,67 são conhecidos como apatitas, por exemplo, hidroxiapatita e fluorapatita (ELIAZ *et al.*, 2017).

Os CaP compartilham várias características como sua bioatividade e biocompatibilidade (JEONG *et al.*, 2019). Eles possuem propriedades mecânicas reduzidas, são frágeis, têm baixa resistência ao impacto e tensão de tração, no entanto, sua resistência à compressão é muito satisfatória, sendo superior à do osso normal (ELIAZ *et al.*, 2017). Os CaP são caracterizados por diversos elementos, como composição química (estequiometria e pureza), homogeneidade, distribuição da fase, tamanho/forma dos grãos, cristalinidade, tamanho e distribuição da porosidade (PRAKASAM *et al.*, 2015).

Tabela 4 - Lista de compostos de fosfato de cálcio

Nome	Símbolo(s)	Formula	Ca/P
Fosfato monocálcico mono-hidratado	(MCPM) e (MCPH)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5
Fosfato monocálcico anidro	(MCPA) e (MCP)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5
Fosfato dicálcico dihidratado (Brushite)	(DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0
Fosfato dicálcico anidro (Monetite)	(DCPA) e (DCP)	CaHPO_4	1.0
Fosfato octacálcico	(OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
α -Fosfato tricálcico	(α -TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
β -Fosfato tricálcico	(β -TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
Fosfato de cálcio amorfo	(ACP)	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1.2–2.2
Hidroxiapatita	(HA) e (HAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67

Fonte: HE *et al.* (2014). “Adaptado para fins didáticos”

A adesão celular à superfície do material é fortemente influenciada pela rugosidade superficial, solubilidade, carga superficial e energia superficial dos CaP. Além disso a reabsorção, processo pelo qual a biocerâmica é absorvida no corpo, seja por células (como macrófagos e osteoclastos) ou por dissolução também depende do conteúdo da fase do CaP, tamanho da partícula, cristalinidade e porosidade (JEONG *et al.*, 2019)

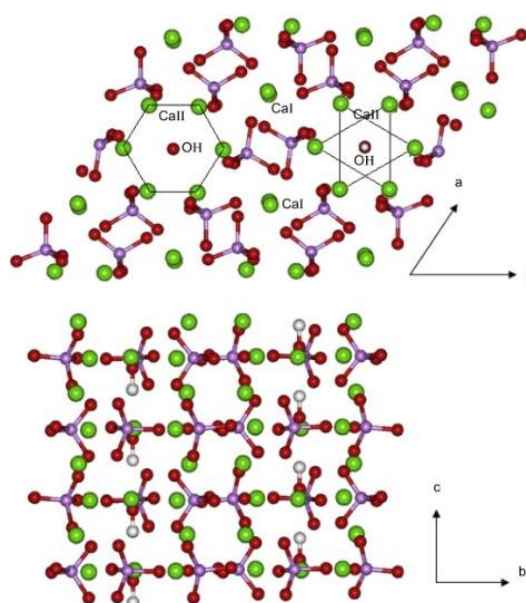
Durante a síntese é possível controlar a composição do produto ajustando a proporção de cálcio para fosfato (Ca/P). A hidroxiapatita e o fosfato β -tricálcico (β -TCP) são os mais utilizados, principalmente em combinação na chamada cerâmica bifásica de fosfato de cálcio por apresentar uma fase mais estável como a hidroxiapatita (HA) e outra com maior reabsorção como o β -fosfato tricálcico (ZWINGENBERGER *et al.*, 2012).

Biomateriais de CaP nanoparticulado podem obter uma regeneração óssea significativamente melhor *in vivo* que os biomateriais CaP convencionais porque: a) apoia a ligação/proliferação de células-tronco e induzem a diferenciação osteogênica, em alguns casos, mesmo sem suplementos osteogênicos; b) a influência dos padrões de superfície de nano-CaP no alinhamento celular não é proeminente devido à distribuição não uniforme de nano-cristais; c) o nano-CaP pode alcançar melhor regeneração óssea do que os biomateriais convencionais do CaP (WANG *et al.*, 2014).

2.3.1.2 Hidroxiapatita (HA)

HA é o mineral comum encontrado nos ossos e dentes dos vertebrados. A HA derivada de fontes naturais ou sintéticas é conhecida como uma substância bioativa e osteocondutora capaz de estabelecer uma forte ligação química com o tecido ósseo hospedeiro sendo avaliada como excelente material para enxertia. A HA é considerada não tóxica, não imunogênica, e sua estrutura é cristalograficamente semelhante à do mineral ósseo com quantidade adequada de substituição de carbonato. A HA estequiométrica tem a fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A proporção atômica entre cálcio e fosfato é de 1,67 (MURUGAN *et al.*, 2005; AL-SANABANI *et al.*, 2014) (Figura 4).

Figura 4 - Representação da estrutura de hidroxiapatita



Legenda: Representação da estrutura hidroxiapatita perpendicular ao cristalográfica c e um eixo, mostrando o OH - canais e os diferentes tipos de íons de Ca (Ca = verde, O = vermelho, P = roxo, H = branco)

Fonte: LAURENCIN *et al.* (2011). "Adaptado para fins didáticos"

O potencial osteocondutor da HA sintética deve-se a sua semelhança química com a HA natural mesmo diferindo em termos de microestrutura física, tamanho e porosidade do cristal (SHEIKH *et al.*, 2015). Este biomaterial possui alta resistência

mecânica e pode sofrer degradação celular sem favorecimentos de subprodutos tóxicos (WUBNEH *et al.*, 2018).

A HA pode ser sintetizada em altas temperaturas e/ou em baixas temperaturas, as primeiras apresentam boa cristalinidade e tamanho de cristais grandes, essas partículas grandes são altamente resistentes à biodegradação no organismo e o segundo apresentam baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos. A HA sintetizada por precipitação via úmida possui características similares às do tecido ósseo e dentário (COSTA *et al.*, 2009; JANG *et al.*, 2017).

O início da biodegradação acontece por as alterações nos fluidos circundantes que geram um processo de dissolução físico-química, finalizando com a absorção de biomoléculas mediada geralmente por células osteoclásticas e às vezes por macrófagos (KATTIMANI *et al.*, 2016).

2.3.1.3 Nano-Hidroxiapatita

O prefixo “nano” significa especificamente uma medida de 10^{-10} U. Refere-se à faixa dimensional de 0,1 nm a 100 nm. Nesse sentido a HA biológica apresenta características de nano cristal. As nanopartículas sintéticas (NPs) menores que 100 nm têm a maior eficácia relatada em relação à integração celular e junto à forma dos grãos desempenham um papel importante nas propriedades finais da cerâmica (PRAKASAM *et al.*, 2015)

A HA em escala nanométrica possui propriedades funcionais superiores às de sua contraparte em microescala, particularmente a atividade superficial e a estrutura ultrafina são as propriedades mais imperativas para a interação tecido-enxerto após a implantação. Sua alta relação área/volume de superfície, homogeneidade química superior e uniformidade microestrutural resultam em maior integração óssea e propriedades mecânicas (CATLEDGE *et al.*, 2002; D'ELÍA, *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que a nano-HA promove maior adesão, diferenciação, proliferação, osteointegração e deposição de minerais contendo Ca em sua superfície, em comparação com a micro-HA convencional, o que leva a uma melhor formação de novo tecido ósseo dentro de um curto período de tempo (WEBSTER *et al.*, 2000).

Adicionalmente, podem produzir altos níveis de fosfatase alcalina comparado às microesferas de hidroxiapatita após 14 dias de incubação (DOMINGOS *et al.*, 2017).

Nanopartículas e nano cristais com uma grande área de superfície representam um grande interesse em áreas de aplicações como cimentos ósseos sejam injetáveis ou controlados como enxertos ósseos sintéticos que tentam imitar a estrutura complexa e propriedades mecânicas superiores do osso (DOROZHKIN, 2010).

2.4 Óxido de zinco (ZnO) Nanoparticulado

O zinco tem sido amplamente estudado na última década para determinar suas funções fisiológicas e bioquímicas por ser um oligoelemento necessário para seres humanos, animais e plantas (TANG *et al.*, 2016). Encontrar-se no corpo como componente principal de vários sistemas enzimáticos onde participa do metabolismo do corpo, na síntese de proteínas e ácidos nucleicos, hematopoiese e neurogênese (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSK e JESIONOWSKI, 2014)

As NPs de ZnO têm sido amplamente exploradas para várias aplicações biomédicas, incluindo atividades anticâncer, antidiabética, antifúngica, anti-inflamatória e antibacteriana, bem como, para aplicações de administração de fármacos (MISHRA, 2017). Contudo, pode produzir efeitos citotóxicos em vários tipos de células, incluindo células cancerígenas de Caco-2 *in vitro* sendo que a toxicidade das nanopartículas de ZnO foi dose e tempo dependente. Mostrou efeito citotóxico em células osteoblásticas, células epiteliais bronquiais humanas, células renais, células de adenocarcinoma alveolar, hepatócitos e células renais embrionárias (AHAMED *et al.*, 2011; HENG, *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2013; PUJALTÉ *et al.*, 2011; NAIR *et al.*, 2009). Tornando-se uma das nanopartículas de óxido metálico mais popular em aplicações biológicas devido à sua excelente biocompatibilidade, baixo custo e baixa toxicidade (JIANG *et al.*, 2018).

NPs de ZnO tem mostrado desde sua química à superfície, biocompatibilidade para células pré-osteoblásticas, promoção da proliferação e diferenciação celular e também em termos de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus aureus* e Gram negativas, como a *Escherichia coli* (GARINO *et al.*, 2019). Atividade antimicrobiana do ZnO é devida as suas propriedades como área

superficial específica e ampla atividade para bloquear um amplo escopo de grandes agentes patogênicos. Acredita-se que isso é devido a sua capacidade de induzir geração excessiva de espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido, radicais hidroxila e produção de peróxido de hidrogênio (ZHANG *et al.*, 2015).

A morfologia das nanopartículas de óxido de zinco depende do processo de síntese e podem ser nanobastões, nanoplacas, nanoesferas, nanocubos, hexagonais, tripés, tetrápodes, nanofios, nanotubos, *nanocages*, nanoflores (SIDDIQI *et al.*, 2018).

2.5 Polímeros

Polímeros são macromoléculas compostas de cadeias de monômeros de repetição ligados covalentemente que podem ser iguais ou diferentes. Polímeros biodegradáveis são ideais e comumente usados em aplicação clínica, devido à possibilidade de controlar suas propriedades de biodegradabilidade e taxa de degradação (SHEIKH *et al.*, 2015).

Para o sucesso da interação celular e química de superfície dos polímeros são necessários critérios como: a) Permitir a adesão e crescimento das células; b) Pós-implantação *in vivo*, não deve haver resposta inflamatória ou tóxica ao polímero ou a seus produtos de degradação; c) porosidade suficientemente alta que esteja interconectada; d) possuir alta área de superfície e espaço adequado para matriz extracelular; e) ser completamente biodegradável com tempo de reabsorção controlado da matriz do andaime (taxa de degradação que corresponde idealmente ao tecido ósseo em regeneração) (FREED *et al.*, 1994; LLOYD, 2002; RAZAK *et al.*, 2012).

Atualmente, os polímeros naturais têm recebido atenção devido às propriedades únicas, como não toxicidade, degradabilidade e boa compatibilidade biológica (LI *et al.*, 2009). Portanto, polímeros biodegradáveis naturais e sintéticos têm sido pesquisados para reparo ósseo. Enquanto os polímeros naturais possuem excelentes características de biocompatibilidade e degradação fisiológica, eles sofrem particularmente de menor resistência mecânica e são utilizados em processos de fabricação e síntese. Os polímeros sintéticos são alternativos para os desafios

mecânicos enfrentados pelos polímeros naturais, porém são caracterizados por uma menor adesão celular (WUBNEH *et al.*, 2018).

2.5.1 Quitosana

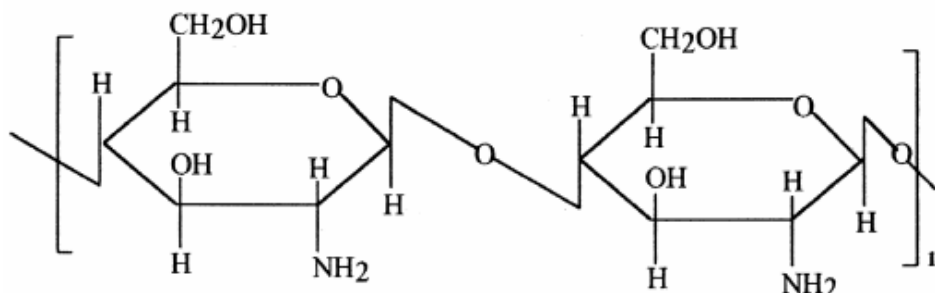
A quitosana, quimicamente é um copolímero linear, composta de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, é insolúvel em soluções aquosas de pH neutro ou básicos, enquanto solúveis em pH ácidos (FIGURA 5). A quitosana pode ser obtida pela desacetilação da quitina. A quitina é o segundo biopolímero natural (polissacarídeo) mais abundante da terra após a celulose (KUMAR *et al.*, 2000; MADIHALLY *et al.*, 1999).

A quitosana e seus derivados são biomoléculas de grande impacto devido as suas propriedades poli-eletrolíticas com a presença de grupos funcionais reativos (um grupo amino e grupos hidroxila primário e secundário), capacidade de formação de gel, alta capacidade de absorção, biodegradação completa, influência bacteriostática e fungistática, antitumoral e possui excelentes propriedades como biocompatibilidade, não toxicidade com os tecidos vivos (SHI *et al.*, 2006).

A degradação da quitosana *in vivo* ocorre por efeito das lisozimas e é regulada por hidrólise dos resíduos acetilados com a taxa de degradação sendo inversamente relacionada ao grau de cristalinidade e acetilação. Por outro lado, a taxa de degradação pode ser afetada significativamente pelas alterações química do polímero de quitosana, por tanto, formas com alto grau de desacetilação (porcentagem de grupos amino presentes no biopolímero), demonstraram uma degradação lenta *in vivo* e, portanto, tem sido usada em muitas aplicações biomédicas, incluindo curativos e administração de medicamentos ou genes (SHEIKH *et al.*, 2015).

Os osteoblastos, fibroblastos, macrófagos e queratinócitos apresentam interação positiva com a Quitosana em termos do reparo e regeneração de tecido (MADIHALLY *et al.*, 1999). Possui aplicação na cicatrização ao estimular a formação de tecido de granulação, ajuda na re-epitelização, formação de fibroblastos e ativação de macrófago, e no tecido ósseo tem sido utilizada como substituto ósseo osteogênico e como compósito Quitosana-fosfato de cálcio (SHI *et al.*, 2006).

Figura 5 - Estrutura química da quitosana.



Fonte: RAVI KUMAR, 2000

Diferentes sistemas de cimentos de fosfato de cálcio têm sido propostos incorporando Quitosana, dentre eles estão relatados nas pesquisas de Fang, *et al.* (2019) do cimento ósseo bio-composto de quitosana / fosfato tricálcico, Rattanachan *et al.* (2020) cimento ósseo injetável quitosana / fosfato de cálcio bifásico, Hesaraki *et al.* (2014) cimentos ósseos contendo fosfato de cálcio e quitosana / ácido hialurônico. Weir *et al.* (2010) sobre o cimento de fosfato de cálcio- quitosana para a entrega de proteína morfogênica 2 óssea humana recombinante (rhBMP-2) via composto de CPC-quitosana.

A quitosana foi introduzida como um arcabouço regenerativo de tecidos porque fornece um bom suporte mecânico e promove a fixação, proliferação e diferenciação celular (Sukpaita *et al.*, 2019). Além disso, a quitosana também pode ser preparada em uma variedade de formas, nomeadamente hidrogéis e xerogéis, pó, grânulos, filmes, comprimidos, cápsulas, microesferas, micropartículas, nanofibrilas, fibras têxteis e compostos inorgânicos (MUZZARELLI *et al.*, 2015).

2.6 Doxíciclina

A doxíciclina (DOX) é um antibiótico comumente usados no tratamento de infecções ósseas, principalmente na periodontite, devido à sua forte atividade contra patógenos periodontais e seus efeitos antibióticos de amplo espectro. A DOX é estável em soluções ácidas e instável em soluções básicas (TAMIMI *et al.*, 2008). Sua estrutura isomérica provém da tetraciclina, e é de especial interesse devido a suas características antibióticas, anti-inflamatórias, anti-colagenases e imunossupressoras

bem conhecidas (SILVA *et al.*, 2016). A doxiciclina inibe as metaloproteinases da matriz (MMPs) e limita a reabsorção óssea das colagenases e gelatinases por um mecanismo não relacionado com a atividade antibiótica de essas drogas (ONG e TAYLOR, 2003).

Dois mecanismos têm sido relatados para inibição das metaloproteinases da matriz, o primeiro relacionado com a capacidade de inibir diretamente as MMPs já ativadas ligando os íons metálicos, cálcio e zinco, no domínio catalítico das enzimas, e o segundo, regulando negativamente a expressão de precursores inativos pró-MMPs e bloquear a ativação desses zimogênios (GOLUB *et al.*, 2008).

Franco *et al.* (2011) demonstraram que DOX inibe a osteoclastogênese induzida por RANKL por seu efeito inibitório na atividade da enzima MMP-9, pelo qual pode levar ao desenvolvimento de uma abordagem terapêutica para a doença reabsortiva óssea causada por RANKL.

Tem se demonstrado que a DOX em doses sub-terapêuticas apresenta efeitos significativos na perda de inserção periodontal reduzindo sua progressão, na inflamação gengival e perda óssea alveolar reduzindo a gravidade, diminuindo a presença de efeitos colaterais associados à antibioticoterapia (PAYNE *et al.*, 2007; REINHARDT *et al.*, 2007; WALKER *et al.*, 2007)

Os cimentos carregados com antibiótico não são uma prática nova e são usados em terapias ortopédica há mais de três décadas, sendo bem-sucedidos na redução das taxas de infecção após artroplastia articular (WALKER *et al.*, 2017). Convencionalmente tem sido usado o polimetilmetacrilato como sistema de administração de medicamentos, porém, os cimentos à base de fosfato de cálcio impregnados de antibióticos têm mostrado maior eficácia de eluição do fármaco (KISANUKI *et al.*, 2005).

A incorporação da DOX em cimentos foi estudada por Daley *et al.* (2018) propuseram sua utilização como auxiliar na curetagem para o tratamento de cistos ósseos aneurismáticos Mestres *et al.* (2019) avaliou a DOX como terapia antimicrobiana para erradicar a osteomielite e o processo de regeneração ósseas em um modelo de estudo animal, utilizando cimentos à base de fosfato de cálcio (CPC) carregados com e sem doxiciclina.

O efeito da DOX foi pesquisado em diferentes formas na regeneração óssea. Pastorino *et al.* (2015) projetou uma forma de dosagem inovadora para a doxiciclina incorporada em espumas de fosfato de cálcio injetável. Silva *et al.* (2016) observaram que a utilização de doxiciclina na forma de gel para preenchimento de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos demonstrou ter um alto potencial para regeneração de tecidos ósseos.

Zhang *et al.* (2019) em um estudo em roedores investigaram a formação óssea vertical com substituto ósseo dopado com DOX e concluíram que o tratamento com DOX para substituto ósseo promoveu a aposição óssea ao redor do enxerto e demonstraram que a combinação de EOB e DOX melhora o aumento ósseo vertical no modelo de roedores.

Diante novas perspectivas distintos antibióticos têm sido propostos para serem utilizados em combinação com CPCs, como aminoglicosídeos (gentamicina), cefalosporinas (cefalexina) em aplicações de regeneração óssea, porém podem ter efeitos colaterais indesejáveis, como por exemplo, a gentamicina que pode afetar a viabilidade celular, proliferação e metabolismo; as cefalosporinas inibem a função das células osteoblásticas (POUNTOS *et al.*, 2011).

Torquato (2020), preparou e caracterizou um cimento dentário contendo doxiciclina para determinar o comportamento em células nervosas da linhagem HS-Schwann de humanos. Esse cimento foi avaliado físico-quimicamente e a citotoxicidade em fibroblastos 3T3-L1 foi determinada, bem como a atividade antimicrobiana frente a cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus* e periodontopatogênicas tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. O cimento teve atividade inibitória antibacteriana e em células de Schwann promoveu o crescimento e a atividade mitótica celular.

2.7 Cimentos ósseos

Os cimentos ósseos são obtidos pela mistura de um biomaterial em pó com um líquido, que pode endurecer depois de implantado na forma de pasta no corpo (GINEBRA *et al.*, 2019). De acordo com sua composição química, podem ser agrupados como cimentos ósseos acrílicos, cimentos de fosfato de cálcio (CPCs), cimentos de sulfato de cálcio, e Cimentos ósseos carregados de drogas (YOUSEFI *et al.*, 2019).

Os cimentos acrílicos usam o poli (metacrilato de metila) (PMMA) um polímero pertencente à categoria das resinas acrílicas, obtido a partir da mistura em temperatura ambiente de um monômero (metacrilato de metila, MMA) e um polímero (partículas de polimetilmetacrilato pré-polimerizadas) na presença de um iniciador, um ativador e um estabilizador (BISTOLFI *et al.*, 2019).

O uso de cimentos PMMA com antibiótico está associada na utilização profilática de infecções que podem acontecer em variadas situações clínicas como durante a substituições articulares totais. Dentre os principais antibióticos que têm sido utilizados nos cimentos poliméricos para regeneração óssea encontram-se a eritromicina, aminoglicosídeos e a vancomicina (ARORA *et al.*, 2013).

Os PMMA apresentam uma alta resistência mecânica e tempo de trabalho adequado bem como fácil aplicação ainda apresentam aplicações na oftalmologia, odontologia e ortopedia, nesta última para a remodelação de fraturas vertebrais osteoporóticas bem como para fixação de implantes protéticos. Porém, várias desvantagens têm sido relatadas associadas a seu uso, incluindo a não biodegradabilidade, a toxicidade do monômero, a geração de calor durante a polimerização que é exotérmica e o vazamento do monômero o que limita suas aplicações (HE *et al.*, 2015; YOUSEFI *et al.*, 2019)

A primeira formulação de cimento de fosfato de cálcio foi desenvolvida por Brown e Chow, em 1987 (Patente dos EUA No. 4.518.430), e consistiu numa mistura equimolar do pó de fosfato de tetracálcio e fosfato dicálcio (anidro ou di-hidratado) com solução de água destilada para formar uma pasta. A diluição dos sais no sistema aquoso fornece Ca e P, para a formação *in vivo* da HA precipitada. Após 24 horas os

cristais estão completamente formados, embora em alguns casos, podem estar presentes materiais de partida que não reagiram.

Tabela 5 - Vantagens e desvantagens do uso de cimentos de fosfato de cálcio

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Osteocondução e osteoindução: propriedades biológicas iniciais semelhantes às da HA. ✓ Tempo de presa rápido ✓ Moldabilidade: fácil de colocar no local da cirurgia. ✓ Excelente biocompatibilidade ✓ Podem ser usados fatores de crescimento, antibióticos, proteínas morfogenéticas no local. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Fraqueza: uso limitado devido ao potencial colapso do material seguido por a formação de tecido mole ao invés de formação óssea (áreas carregadas). ✓ Pode eliminar o defeito cirúrgico se houver excesso de sangue. A compressão durante a reação de ajuste é recomendada. Formulações contendo alginato de sódio foram estudadas para resolver este problema.

Fonte: AMBARD *et al.* (2006). “Adaptado para fins didáticos”

As propriedades mecânicas e biológicas desses cimentos podem ser determinadas a partir da reação de presa do cimento, resultando em um material altamente poroso, o que implica que sua área específica é alta. Os cimentos de CaP são quebradiços e apresentam resistência à flexão e tensão relativamente baixa. As propriedades mecânicas dos cimentos CaP dependem de sua composição (ZWINGENBERGER *et al.*, 2012).

Os cimentos exibem vantagens sobre os blocos de HA sinterizados já que não exigem que os cirurgiões dentistas façam ajustes no local cirúrgico ou tenham que esculpir o enxerto (KENT *et al.*, 1986). Entre as aplicações clínicas dos CPC encontram-se as odontológicas e ortopédicas, craniofaciais / maxilofaciais, em sítios osteo-necróticos e aplicações dentárias (AMBARD *et al.*, 2006) (TABELA 5).

Devido ao seu grande potencial como material de enxerto, um grande número de formulações de CPC foi preparado e estudado para possíveis aplicações clínicas. Julien *et al.* (2007) preparou CPC com fosfato e carbonato de cálcio amorfo (ACCP) dopando-o com zinco (ACCp-Zn) e íons fluoreto (ACCP -F). Liu *et al.* (2006) desenvolveram uma pasta aquosa concentrada de cimento fosfato de cálcio (CPC) injetável.

Os CPC apresentam alguns requisitos específicos para seu uso. Por exemplo, devem tomar presa lentamente para fornecer ao cirurgião tempo suficiente para implantá-lo e evitar atrasos na operação. Outro requisito é a viscosidade adequada. Existem dois tipos de cimentos - os injetáveis na forma de pasta e os aplicados e moldados pelo cirurgião, cada um requer um grau diferente de viscosidade (ELIAZ *et al.*, 2017).

Para aumentar as características mecânicas incorporou-se aditivos de reforço biocompatíveis e bioabsorvíveis como a quitosana. Fang, *et al.* (2019) desenvolveram um compósito CPC com quitosana. Os resultados mostraram que o cimento ósseo biocompósito exibiu menor temperatura e maior tempo de cura, maior perda de peso e porosidade após a degradação, menor módulo de compressão de Young e resistência à compressão final em comparação com os de cimento de polimetilmetacrilato puro.

A adição de uma fase polimérica permite a formação de compósitos que alteram as propriedades dos cimentos. A adição de polímeros aos cimentos tem sido usada para alterar o tempo de presa, resistência à coesão / lavagem, injetabilidade, macroporosidade, melhora as propriedades mecânicas como a resiliência, degradação a longo prazo, propriedades de eluição de medicamentos e resposta biológica (PEREZ, 2012). Embora as propriedades possam ser aprimoradas o efeito desejado no compósito final vai depender da quantidade e o tipo de polímero, entre outras características.

Os polímeros podem ser adicionados à fase líquida, bem como à fase sólida, podendo ser sintéticos ou naturais. Exemplos de polímeros naturais que podem ser empregados: alginato, quitina, quitosana, seda, hialuronato, celulose, gelatina, soja, albumina, colágeno e sulfato de condroitina. Os polímeros sintéticos incluem polietilenoglicol (PEG), poli (etil)acrilato, poliésteres e poliéteres, ácido poliacrílico (PAA), fibrina, PLGA, poli (ácido glicólico) (PGA), policaprolactona (PCL), ácido poli- L- lactico (PLLA), fibras de amida, fibras de poliamida, etc (PEREZ, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar comparativamente o potencial osteogênico de um cimento odontológico bioativo à base de quitosana, nano-hidroxiapatita, nanopartículas de óxido de zinco, com (DHCZ) e sem doxiciclina (HCZ) para regeneração alveolar *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar físico-quimicamente a nano-hidroxiapatita e o óxido de zinco nanoparticulado.
- Preparar os Cimentos contendo doxiciclina DHCZ e sem doxiciclina HCZ.
- Avaliar a biocompatibilidade e a neoformação óssea alveolar dos cimentos odontológico bioativo DHCZ e HCZ em defeitos ósseos alveolar após 14 ou 28 dias do preenchimento.
- Avaliar comparativamente o efeito osteocondutor e a neoformação óssea dos cimentos odontológicos bioativos após implantação no defeito ósseo alveolar de ratos em 14 e 28 dias.

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese dos materiais de partida

A Nano-Hidroxiapatita e óxido de zinco nanoparticulado foram sintetizados pelo método de co-precipitação no laboratório de Biomateriais e Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFMG em parceria com o Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais (LEMB), do Departamento de Química, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1.1 Síntese de Nano-Hidroxiapatita

A síntese da nano-hidroxiapatita foi feita por co-precipitação, método descrito com pequenas modificações (RAMÍREZ-AGUDELO *et al.*, 2018). Foram usados: Nitrato de Cálcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (PM 236,15, LabSynth, Diadema, São Paulo, Brasil); Fosfato de Amônio Monobásico $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (PM 115,03, Dinamica, São Paulo, SP, Brasil). Preparou-se a primeira solução contendo 15,75 g de Nitrato de Cálcio tetrahidratado em 120 mL de água deionizada, a qual foi colocada em agitação magnética até completa homogeneização.

A segunda solução foi preparada com 4,60 g de Fosfato de Amônio Monobásico em 150 mL de água deionizada e homogeneizada em agitador. A essa solução adicionou-se hidróxido de amônio 25%, NH_4OH (MERCK), lentamente, até atingir o $\text{pH} = 11$. Após a preparação das soluções, a 1ª solução foi colocada no banho-maria em silicone com agitação e temperatura de 100°C . Em seguida a 2ª solução foi adicionada à primeira de maneira graduada pelo método de gotejamento. Esse processo garante a formação da Nano-Hidroxiapatita mediante a precipitação. Em seguida, a reação permaneceu em agitação e aquecimento nessa mesma temperatura por 24 horas. Filtrou-se o precipitado, com bomba à vácuo e utilizou-se água deionizada para alcançar o $\text{pH} = 7,0$. O preparado foi colocado em estufa à 80°C por 24 horas para secagem. Logo após as partículas foram maceradas utilizando-se pistilo e almofariz metodologia adaptada de LIAO *et al.* (2016). O produto obtido foi caracterizado físico-quimicamente pelo método de Difração de Raios X (Difratômetro SHIMADZU XRD-7000).

4.1.2. Síntese de Óxido de Zinco Nano particulado

O ZnO foi sintetizado por reação de co-precipitação descrito por Wu et al. (2006) com modificações. Foram utilizados os seguintes reagentes: Hidróxido de cálcio NaOH (Sigma-Aldrich) e Nitrato de Zinco Hexahidratado [Zn (NO₃)₂ .6H₂O]. Preparou-se a primeira solução contendo: 4g de NaOH em 100 mL de água deionizada que foram colocados em um agitador magnético para homogeneização. Uma segunda solução foi preparada com 14,87g Nitrato de Zinco Hexahidratado em 100 mL de água deionizada e homogeneizada. A seguir, a primeira solução foi colocada em banho-maria de silicone, agitação e temperatura de 70°C. Em seguida a 2ª solução foi adicionada à primeira de maneira graduada pelo método de gotejamento. Esse processo garante a formação do produto mediante a precipitação. A partir desse momento, o balão de reação ficou por 24 horas em agitação e aquecimento na temperatura de 70°C.

O precipitado obtido foi filtrado em bomba de vácuo com água deionizada (pH= 7,00). O preparado foi seco em estufa a 80°C por 24 horas. Logo após macerou-se as partículas com pistilo e almofariz. O produto obtido foi caracterizado físico-quimicamente pelo método de Difração de Raios X. Difratorômetro SHIMADZU XRD-7000.

4.2 Difração de raios-X

As partículas sólidas de Nano-HA e Óxido de Zinco Nanoparticulado foram caracterizadas pelo método de Difração de raios X (DRX) em pó. Os padrões de DRX foram registrados utilizando um difratômetro SHIMADZU XRD-7000. Os dados foram obtidos utilizando tubo de cobre (Cu K α) $\lambda = 1,54051 \text{ \AA}$ em ângulo 2θ , variando de 4° a 60° com uma taxa de varredura de 2θ min, com a finalidade de verificar a correta formação do produto final. Os padrões de DRX das amostras foram obtidos usando os softwares OriginLab OriginPro v9.0 SR2. Essa técnica não destrutiva caracteriza materiais cristalinos fornecendo informações sobre estrutura, fases, e outros parâmetros. Dessa maneira o padrão de difração de raios-X é a impressão digital de arranjos atômicos periódicos em um determinado material (BUNACIU *et al.*, 2015).

4.3 Preparação dos Cimentos

Os cimentos ósseos foram sintetizados no laboratório de Biomateriais e Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFMG e preparados de acordo com Torquato (2020).

A fase sólida foi composta de 50 mg de nano-hidroxiapatita, 50 mg de óxido de zinco nanoparticulado, 50 mg de quitosana de baixo peso molecular poli (chitin D - glucosamine deacetilada), (Sigma-Aldrich, Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil), com e sem 5 mg de doxiciclina (Araújo distribuidora, Belo Horizonte, Brasil) e 25 mg de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) P.M. 270,32 NEON São Paulo, SP, Brasil, usado como agente oxidante.

A preparação da fase líquida consistiu em 1,3 mL de fosfato-tampão salino (PBS), 1500 mg de polietilenoglicol (PEG 10.000 g/mol), Brimingham Polymers Ins., Pelham, Al, EUA], e 0,080 mL de tetrametiletilenodiamina (TEMED) $C_6H_{16}N_2$, (P.M. 116,21 g/mol Sigma-Aldrich – Vetec, Brasil LTDA). O total da fase sólida foi misturado com 0,14 mL da fase líquida até formar uma pasta. Esta pasta foi colocada em moldes de silicone.

4.4 Esterilização dos materiais de partida e dos cimentos

Os materiais sólidos obtidos Nano-Hidroxiapatita, Óxido de zinco Nanoparticulado, a quitosana de baixo peso molecular e o persulfato de potássio foram esterilizados pelo método de radiação UV. Os materiais foram colocados em uma câmara contendo lâmpadas emissoras de radiação UV (254 nm) *Light Electronics*, referência (LE F30T10/GL) por tempo de 30 a 40 minutos.

4.5 Amostragem

A variável utilizada é quantitativa discreta em porcentagem de preenchimento alveolar de volume ósseo.

Segundo a fórmula de Miot (2011):

$$\frac{\text{Variável quantitativa}}{n} = \left(\frac{Z_{\alpha/2} \cdot \delta}{E} \right)^2$$

n – tamanho da amostra; $Z_{\alpha/2}$ – valor crítico para o grau de confiança desejado, usualmente: 1,96 (95%); δ – desvio padrão populacional da variável; E – erro padrão, usualmente: $\pm 5\%$ da proporção dos casos (precisão absoluta), ou $\pm 5\%$ da média ($1,05 \times \text{média}$);

$$n = (1,96 \times 6 / 5)^2$$

$$n = (11,76 / 5)^2$$

$$n = (2,3)^2$$

$$n = 5,2$$

Total = 5 animais por grupo

Em cada grupo experimental adicionou-se 1 animal para um total 6 animais por grupo foram considerados considerando possível perda durante o processo. Para cada tratamento foram utilizados 2 grupos experimentais para serem avaliados em dois tempos. Nos grupos de tratamento de controle negativos e positivo foi definida a utilização da metade dos animais, evocando os princípios dos 3R.

Os 3R correspondem às siglas iniciais em inglês de *reduction* (redução), *refinement* (refinamento) e *replacement* (substituição). O objetivo da redução é diminuir o uso de seres vivos utilizados. Embora eles sejam necessários, pode-se usar outros meios antes de se chegar a essa fase. O refinamento busca minimizar a dor e o estresse do animal através das melhores condutas na pesquisa. E por fim, a substituição, que procura métodos alternativos substituindo assim o uso de animais nos experimentos.

Afim de se confirmar a metodologia, consultou-se uma fórmula diferente, para o cálculo amostral e de acordo com a plataforma de cálculo de número amostral do Laboratório de Estatística e Epidemiologia do Instituto Dante Pazanezzi (disponível em www.lee.dante.br) e as informações acima, o nível de significância adotado e o poder de teste foi estimado em 80% o tamanho da amostra, para grupo, seria de $n=5$ (HASSUMI *et al.*, 2018).

4.6 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) sob o número de protocolo 349/2018 (*vide* Anexo 1).

Para esta pesquisa foram usados 40 ratos adultos jovens, machos, saudáveis da linhagem Wistar Hannover (*Rattus Norvegicus, albinus* Wistar), com 6 semanas de idade, pesando em média 150 gramas, procedentes do Biotério central da UFMG. Os animais foram transferidos para o laboratório de experimentação animal no Departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, onde permaneceram durante 7 dias para adaptação. Apenas animais machos foram utilizados para eliminar qualquer variabilidade hormonal devido ao ciclo reprodutivo das fêmeas.

Os animais foram mantidos durante toda a pesquisa, em gaiolas de polipropileno, com ventilação, forradas com maravalha de madeira, alimentação e água “*ad libitum*”, temperatura controlada entre 23° - 25°C e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, seguindo as determinações da norma ISO 10993-2 para manejo de animais em laboratório.

4.7 Distribuições dos animais nos grupos de experimentação

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de acordo ao tratamento recebido. Cada grupo de tratamento foi subdividido em dois de acordo com o tempo de sacrifício T1 (14) ou T2 (28) dias após a extração dentária e criação do defeito ósseo para avaliação (Tabela 6).

Grupo 1 DHCZ (n=12): Cimento ósseo composto por nano-hidroxiapatita quitosana, óxido de zinco nanoparticulado e doxiciclina e sua fase líquida.

Grupo 2 HCZ (n=12): Cimento ósseo composto por nano-hidroxiapatita Quitosana, óxido de zinco nanoparticulado sem doxiciclina e sua fase líquida.

Grupo 3 controles (n= 8): Coágulo sanguíneo. O animal controle foi utilizado para caracterizar o reparo ósseo após exodontia e criação do defeito ósseo alveolar, servindo como parâmetro para comparação com os animais experimentais.

Grupo 4 MODB (n= 8): Matriz Óssea Desmineralizada Bovina GenOx Org. (Baumer, Registro ANVISA nº 10345500084, São Paulo, SP, Brasil). Esse grupo foi utilizado como controle positivo, para caracterizar o reparo ósseo após exodontia e criação do defeito ósseo alveolar.

Tabela 6 - Distribuição dos grupos e animais

	Grupos I	Grupos II	Grupos III	Grupos IV
7 dias T1	DHCZ (n=6)	HCZ (n=6)	Controle (n=4)	EOB (n=4)
14 dias T2	DHCZ (n=6)	HCZ (n=6)	Controle (n=4)	EOB (n=4)

Fonte: próprio autor

n= número de animais

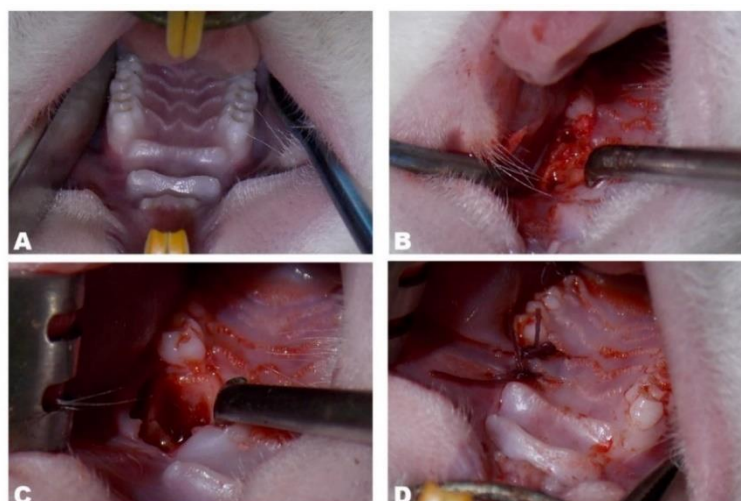
4.8 Cirurgia

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram pesados para calcular a dose referente aos medicamentos de sedação, anestesia e analgesia. Em seguida, a anestesia geral foi aplicada, com injeção por via intramuscular de cloridrato de Ketamina 10% (cetamin – Syntec) na dose de 8 mg/Kg de peso do animal e Xilazina 2% e (Xilazin- Syntec) na dose de 9 mg/Kg de peso do animal segundo o método previamente utilizado por Lanza (2018).

Todas as cirurgias foram realizadas de acordo com as normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais (Lei 6638/08 de maio de 1979) e com os princípios éticos na experimentação animal sob condições de assepsia e anestesia.

Os animais foram colocados em uma mesa operatória apropriada e a área cirúrgica foi isolada com campos cirúrgicos estéreis. Após a anestesia a técnica cirúrgica consistiu em sindesmotomia, luxação do dente e extração do primeiro molar superior direito, verificando em seguida a integridade do alvéolo em relação ao espaço correspondente às 5 raízes. Após a exodontia do elemento dentário, uma broca esférica de carbono estéril de 2 mm sob irrigação com solução salina foi utilizada, para remoção dos septos ósseos alveolares de 3 x 2 x 2 mm, aproximadamente.

Figura 6 - Fotografia do defeito cirúrgico na região alveolar mostrando as etapas da técnica cirúrgica.



Legenda: A) região do primeiro molar superior direito, B) exodontia do primeiro molar superior direito C) defeito ósseo alveolar D) finalização da cirurgia com a colocação das suturas.

Fonte: próprio autor

Foram implantados os cimentos nos grupos de testes, e a formação de coágulo sanguíneo foi estimulado no grupo controle. Finalmente, a sutura das bordas da mucosa do defeito ósseo foi realizada com fio de nylon 4-0 absorvível através da técnica de pontos simples para fechar o alvéolo (FIGURA 6).

Os animais foram eutanasiados de acordo com os tempos operatórios estabelecidos de 14 ou 28 dias após os procedimentos. Para a eutanásia, os animais receberam injeção por via intramuscular com overdose de cloridrato de xilazina 2% (Xilazin – Syntec) e cetamina 10% (cetamin – Syntec) de acordo com os protocolos. Após a eutanásia as maxilas foram dissecadas e imediatamente fixadas em solução de formol a 10% tamponado, em volume igual a vinte vezes o tamanho da peça, as carcaças foram descartadas de acordo com os protocolos.

4.9 Preparação das amostras histológicas

Para o processamento histológico das amostras, as peças obtidas foram fixadas em formol tamponado a 10% por quarenta e oito (48) horas a 5°C. Então as peças foram descalcificadas em solução de ácido nítrico a 7% com EDTA a 10%, permanecendo até apresentar uma consistência macia, aproximadamente após 30 horas, indicando correta desmineralização óssea. Em seguida, realizou-se lavagem das amostras com solução de Ringer e bicarbonato de sódio 10%.

Após esses procedimentos, com auxílio de uma lâmina de bisturi, os tecidos ao redor da região de interesse foram removidos cuidadosamente para preservar o alvéolo dental, em seguida, as peças foram desidratadas gradativamente em álcool e xilol, embebidas em parafina (histocec pastilha, Merck®) e incluídas em uma placa aquecida. Posteriormente, foram obtidos cortes seriados de 4 µm de espessura em micrótomo. Duas lâminas por amostra foram preparadas, para coloração de Hematoxilina/Eosina (HE) e coloração por tricrômico de Masson.

4.9.1 Coloração de Hematoxilina/Eosina (HE)

As lâminas foram submetidas à coloração de Hematoxilina/Eosina (HE), a qual se iniciou com desparafinização em xilol, hidratação na sequência de álcool absoluto, 70%, 50% por 7 minutos, e lavagem em água corrente. Depois, as lâminas foram coradas em hematoxilina seguida de eosina com lavagens em água corrente entre as colorações. Por fim, desidratou-se na sequência de álcool 50%, 70%, absoluto, e foram embebidas em xilol para diafanização e posterior montagem com lamínulas.

4.9.2 Coloração tricrômica de Masson

Para coloração tricrômica de Masson (TM) iniciou-se com desparafinização em xilol por 5 minutos, Hidratação na sequência em álcool 50%, 70%, absoluto por 7 minutos e lavagem em água corrente. Depois as lâminas foram coradas em reagentes soluções A e B: hematoxilina férrica de Weigert solução A e hematoxilina férrica de Weigert solução B por 10 minutos, seguida do reagente fucsina por 6 minutos, continuando com ácido fosfomolibdico por 5 min e por último o reagente Azul de anilina por 5 minutos com lavagens em água corrente entre as colorações. Por fim, são desidratadas utilizando álcool na sequência de 50%, 70%, absoluto e então são embebidos em xilol para posterior montagem com lamínulas.

A coloração tricrômica de Masson cora o colágeno e os ossos imaturos azuis, o citoplasma vermelho claro ou rosa, o osso maduro de vermelho e os núcleos celulares de marrom escuro ou preto (LIU *et al.*, 2016).

4.10 Análise dos resultados

4.10.1 Descrição histológica

Foram realizadas as análises de forma descritiva de todos os cortes histológicos corados pela técnica de H/E e TM. Os cimentos foram observados em toda a extensão dos defeitos ósseos no alvéolo e avaliados de acordo aos aspectos e degradação das partículas, integração com tecido adjacente, neoformação óssea, presença de infiltrado inflamatório e células gigantes multinucleadas. As análises foram realizadas em microscópio óptico (Olympus B51) com lentes objetivas planacromáticas.

4.10.2 Análise histomorfométrica

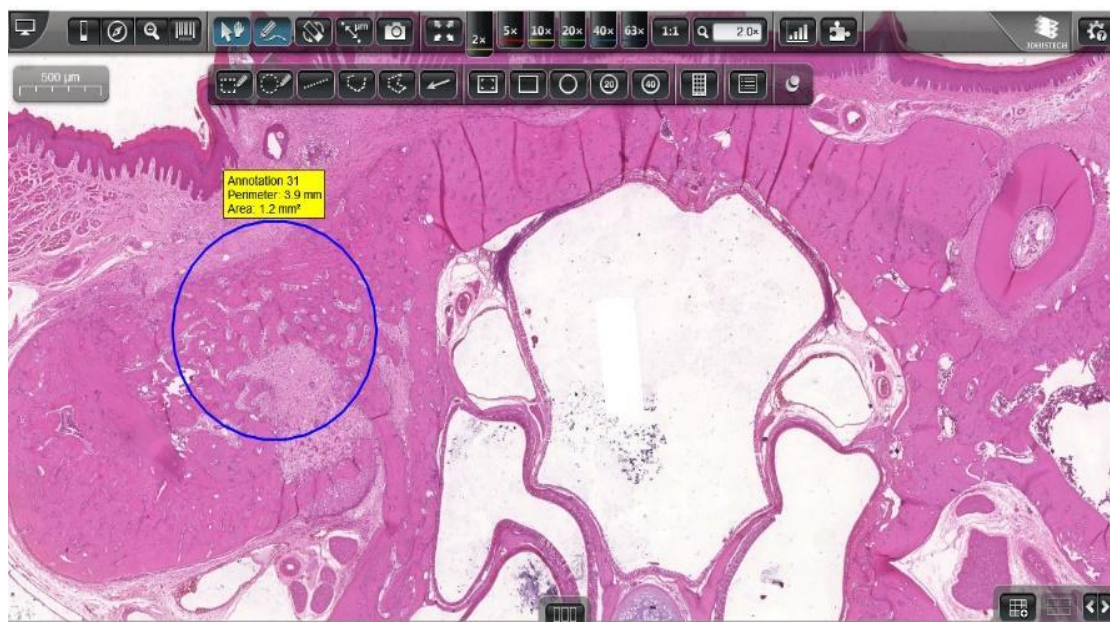
As imagens digitais dos cortes histológicos corados pela técnica de H/E foram obtidas em um microscópio digital *Scanner Panoramic* MIDI (3D HISTECH, Budapeste, Hungria), no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Análises quantitativas foram realizadas utilizando o software *Case Viewer*. Em seguida atingiu-se uma

padronização da área circular para o delineamento e quantificação percentual do tecido ósseo neoformado de 1,2 mm², denominada área total (AT) (FIGURA 7), sendo esse valor considerado como 100% da área total analisada. Em seguida o cálculo da Área de Ósseo Neoformado (AON) foi realizado pelo qual dentro da área total, delimitou-se as áreas de não formação ósseas presentes no campo. Os dados obtidos de tecido ósseo neoformado foram calculados através da soma dessas áreas e subtraídos do total e armazenados em uma planilha de cálculo de Excel.

Para o cálculo da porcentagem de tecido ósseo neoformado em cada amostra utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\begin{aligned} \text{AON (Área de Ósseo Neoformado) mm}^2 &= \text{AON\%} \\ \text{Medida de AT (1,2 mm}^2) &= 100 \% \text{ da área determinada} \\ \text{AON\%} &= (\text{AON mm}^2 \times 100\% / 1,2 \text{ mm}^2) \end{aligned}$$

Figura 7 - Fotografia ilustrativa da demarcação da área total selecionada (AT).



Legenda: O círculo azul demarca a área total selecionada no software caseviewer.

Fonte: próprio autor

4.11 Análise estatística

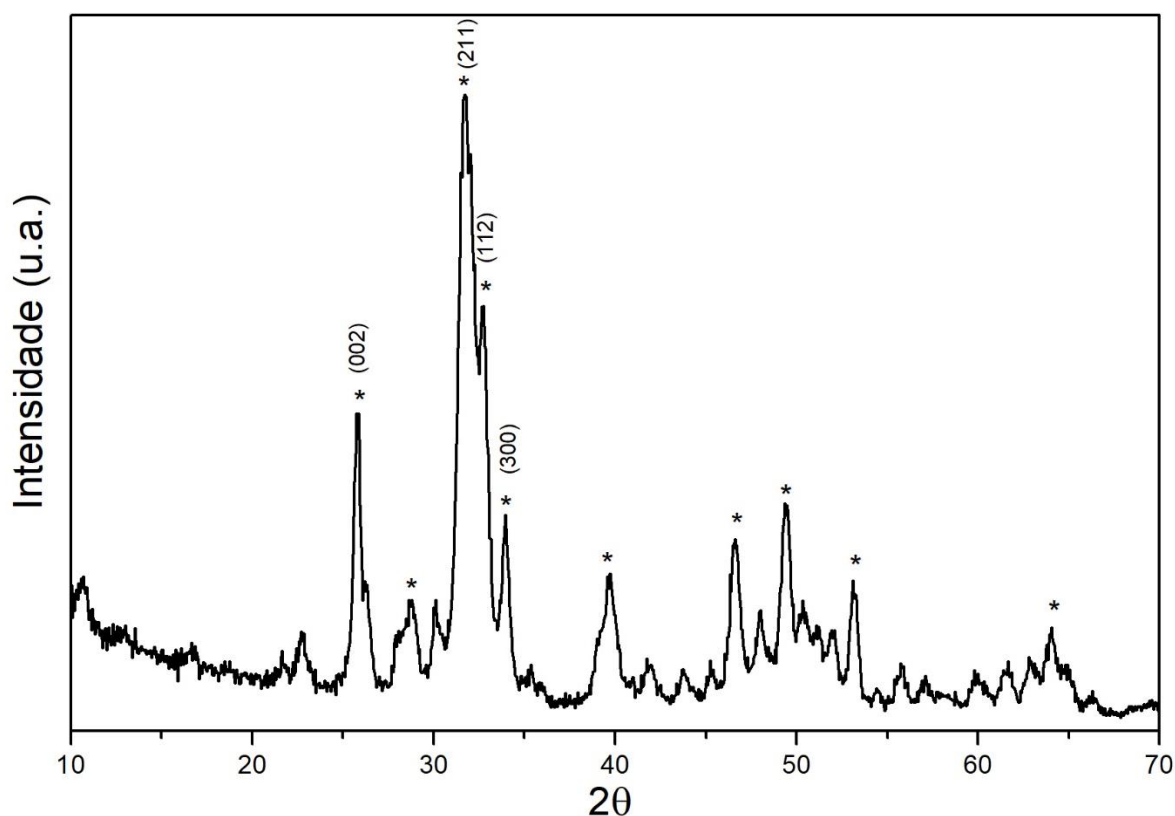
Nos estudos histomorfométricos, os dados de área de tecido ósseo foram apresentados em porcentagem. As análises foram apresentadas como estatísticas descritivas e efetuadas com o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®, IBM Inc., Chicago, IL, EUA) na versão 19.0. Análises exploratórias dos dados forneceram frequências, médias, desvios padrão e medianas, foi utilizado intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. A avaliação da normalidade foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Observou-se uma distribuição não normal dos dados ($P = 0,033$) ANEXO 2, a análise bivariada foi realizada pelo teste e post-hoc Kruskal-Wallis para dados não paramétricos.

5 RESULTADOS

5.1 Difractometria de raios X da Hidroxiapatita

Após sínteses do pó de Nano-HA, a DRX permitiu verificar a presença de picos de difração de HA. Os principais picos para a HA podem ser observados no padrão de DRX (FIGURA 8), 25° (plano 002), 31° (plano 211), 32° (plano 112) 32,9 (plano 300) e são bem consistentes com os da HA cristalina padrão. Nenhuma impureza de hidróxidos de cálcio e fosfatos de cálcio foi detectada. Além disso, foram observados picos amplos de difração de baixa intensidade que podem ser atribuídos à deformação da rede de HA e ao baixo tamanho cristalino (PUVVADA *et al.*, 2010). Os resultados estão de acordo aos relatados por Swain *et al.* (2011).

Figura 8 - Difractometria de raios X da HA em pó

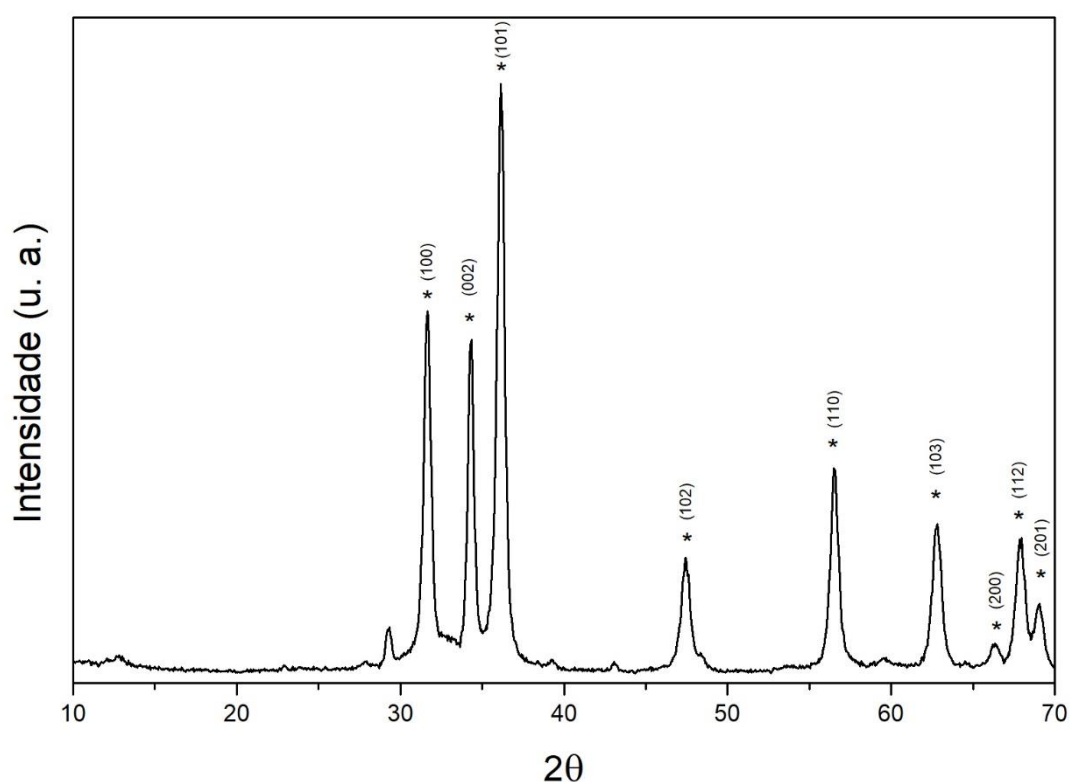


Legenda: Os picos marcados com * pertencem ao HA.
Fonte: próprio autor

5.2 Difractometria de raios X do óxido de zinco

A Figura 9 mostra o difratograma de RX do pó de ZnO, o qual mostrou um padrão cristalino. Os principais picos do padrão de difração correspondentes aos planos de difração de (hkl) 31° (100), $34,3^\circ$ (002), $36,2^\circ$ (101), $47,5^\circ$ (102), $56,9^\circ$ (110), $62,8^\circ$ (103), $67,9^\circ$ (200) e $69,0^\circ$ (112). Todos os picos podem ser atribuídos ao ZnO hexagonal e similar aos dados relatados por Suárez *et al.* (2017); Miri *et al.* (2019).

Figura 9 - Difractometria de Raios X de ZnO em pó



Legenda: Os picos marcados com * pertencem ao ZnO.

Fonte: próprio autor

5.3 Análises Histológicas

5.3.1 Aspectos gerais

Durante a etapa experimental nenhum animal morreu após procedimento cirúrgico experimental dessa forma foi selecionada uma lâmina por amostra para um total 40 lâminas. Uma lâmina do grupo controle T1 foi desconsiderada para análise

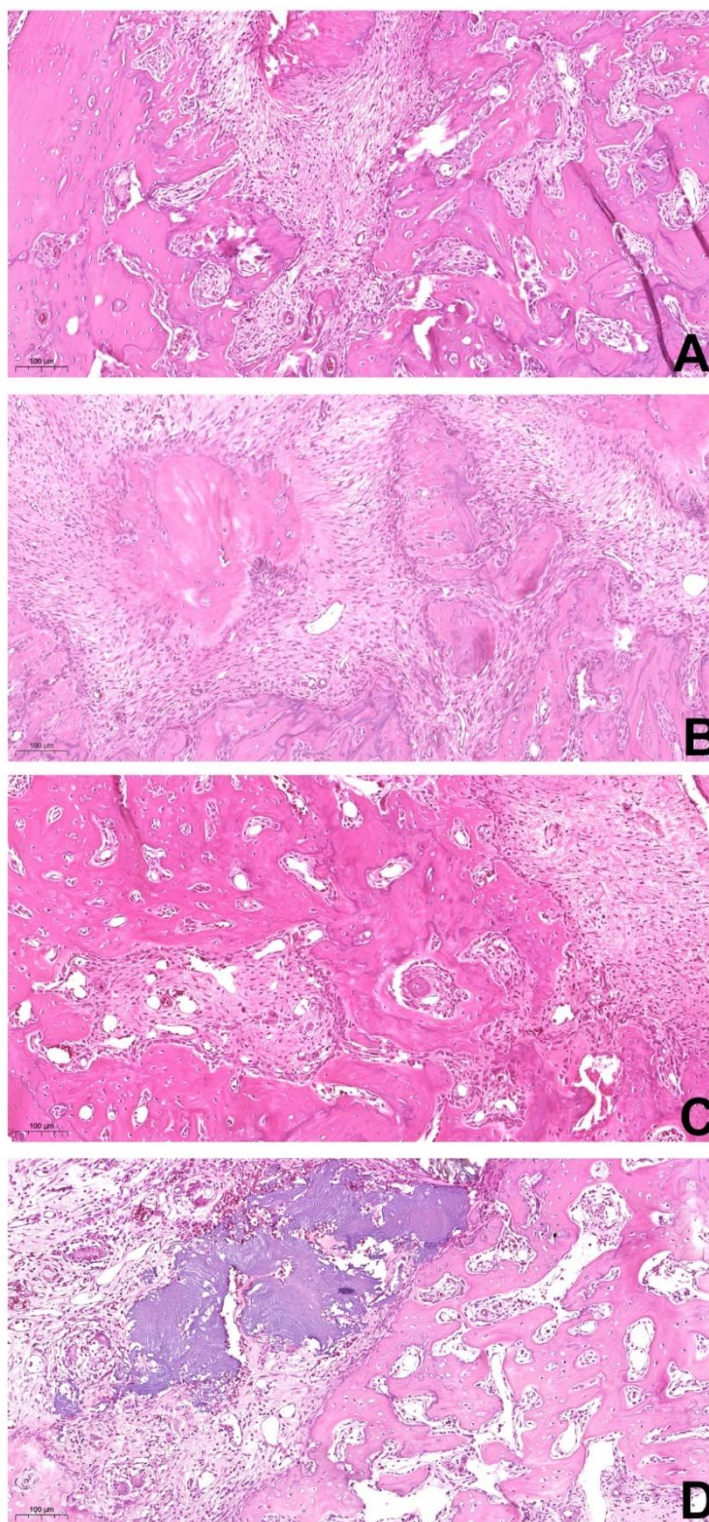
porque foi verificada a presença de um resto radicular. Por tanto, um total de 39 lâminas foram analisadas histologicamente após coloração por hematoxilina & eosina, por histomorfometria e histomorfologia. A presença de colágeno foi avaliada após a coloração tricômica de Masson.

No tempo de 14 dias (FIGURA 10) a presença do biomaterial foi observada em todos os grupos que foram preenchidos com cimentos ou MODB, a degradação aconteceu em maior quantidade no DHCZ do que HCZ e MODB, neste último grupo o material teve menor degradação superficial. A resposta inflamatória dos cimentos DHCZ, HCZ e MODB foi leve, de forma localizada na superfície perto do tecido epitelial e compatível com o trauma cirúrgico. Tecido ósseo neoformado foi observado em forma de trabéculas irregulares porém a presença de osso novo foi maior no cimento DHCZ, este resultado pode ser atribuído a uma maior quantidade de material degradado.

As trabéculas continham osteócitos de forma aleatória e em grandes populações sendo sua presença maior no grupo DHCZ. Uma maior quantidade de osteoblastos cúbicos foi observada nos cimentos DHCZ do que os cimentos HCZ e MODB os quais se encontraram localizados nas bordas das trabéculas ósseas, depositando osso. Nos Grupos preenchidos com cimentos e MODB os osteoclastos gigantes multinucleadas também foram observados nos espaços medulares, sugerindo remodelação ativa.

Nos controles negativos, onde houve formação de um coágulo espontâneo, foram observadas neoformação ósseas com características trabeculares. Revestindo essas cavidades foram observados osteoblastos cuboídes ativos formando osso. A presença de osteoclastos gigantes multinucleados foi pouco observada. Foram observadas lacunas com osteócitos, essas células estavam dispostas de forma muito aleatória e em grande população, indicando que os ossos neoformados precisam ainda ser remodelados. Não houve presença de necrose e hemorragia em nenhum grupo.

Figura 10 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar no tempo de 14 dias.



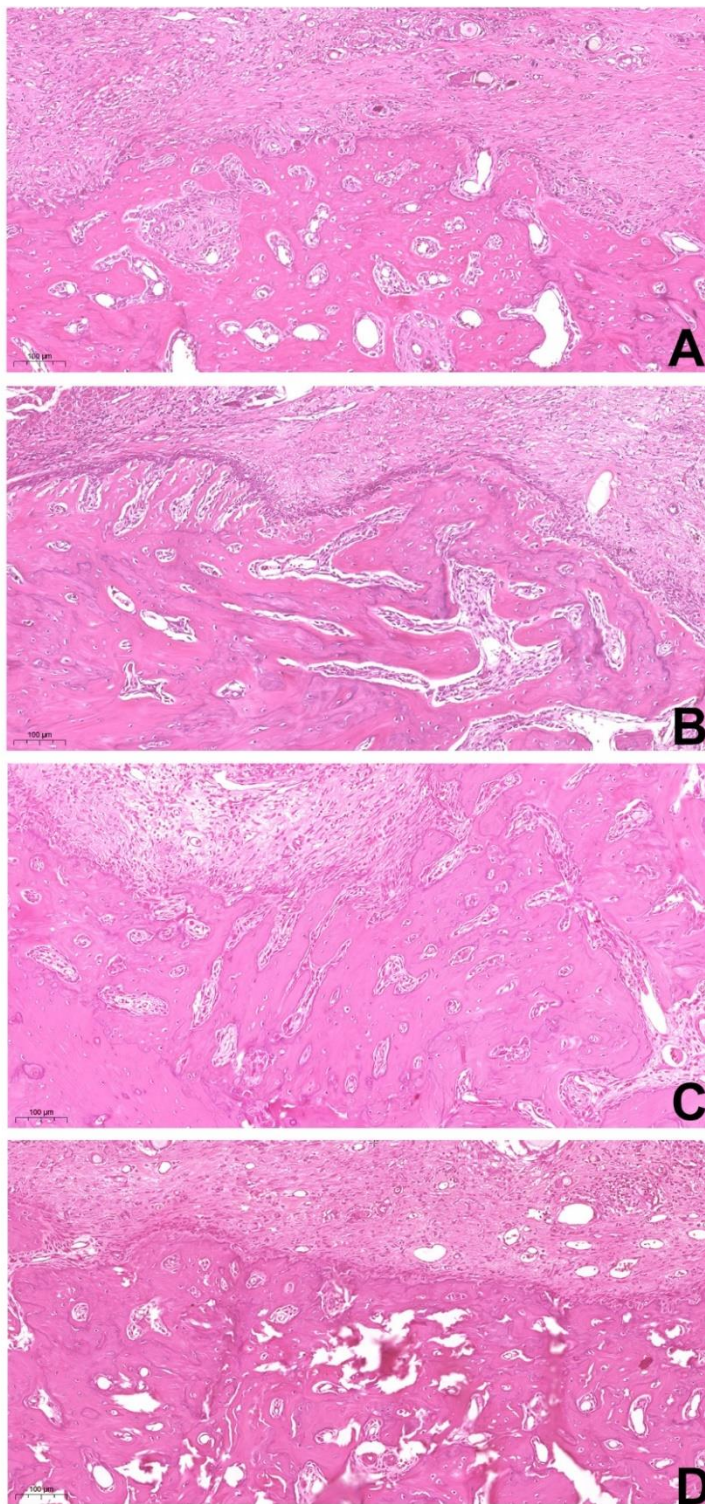
Legenda: A) Grupo tratado com DHCZ B) Grupo tratado com HCZ C) Grupo controle-coágulo D) Grupo tratado com MODB

Fonte: Próprio autor

Tempo 28 dias (FIGURA 11) em todos os grupos que foram preenchidos com cimentos ou MODB a presença de biomaterial foi observada minimamente em comparação com o observado aos 14 dias, a degradação do material não apresentou resposta inflamatória. Em todos os grupos as trabéculas ósseas se encontraram em maior quantidade, enquanto no tempo 2 os espaços medulares foram reduzidos em comparação ao tempo 1. Além disso o grupo tratado com cimento DHCZ apresentou uma maior quantidade de vasos sanguíneo do que o grupo HCZ e MODB. Em todos os grupos de cimentos e MODB foram observados osteoblastos achatados sugerindo atividade reduzida. A presença de osteoclastos foi localizada e observada neste tempo nos grupos tratado com cimentos, porém não foi possível observá-la no MODB como no tempo 1. Os osteócitos em todos os grupos incluído o controle no tempo 2 foram observados mais dispersos na matriz óssea dentro de lacunas que eram de menor tamanho que do que no tempo1 como também uma matriz óssea mais organizada

Nos controles, o número de cavidades medulares e seu tamanho foram drasticamente reduzidos, também foi observada diminuição da presença de vasos sanguíneos em comparação com o tempo 1. Osteoblastos ativos foram observados nas bordas ao longo do osso neoformado. Neste tempo também não houve nas lâminas analisadas presença de osteoclastos. Osteócitos estavam localizados mais dispersos na matriz óssea dentro de lacunas de menor tamanho do que no tempo 1, assim sendo, houve formação de uma matriz óssea mais organizada.

Figura 11 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar no tempo de 28 dias.



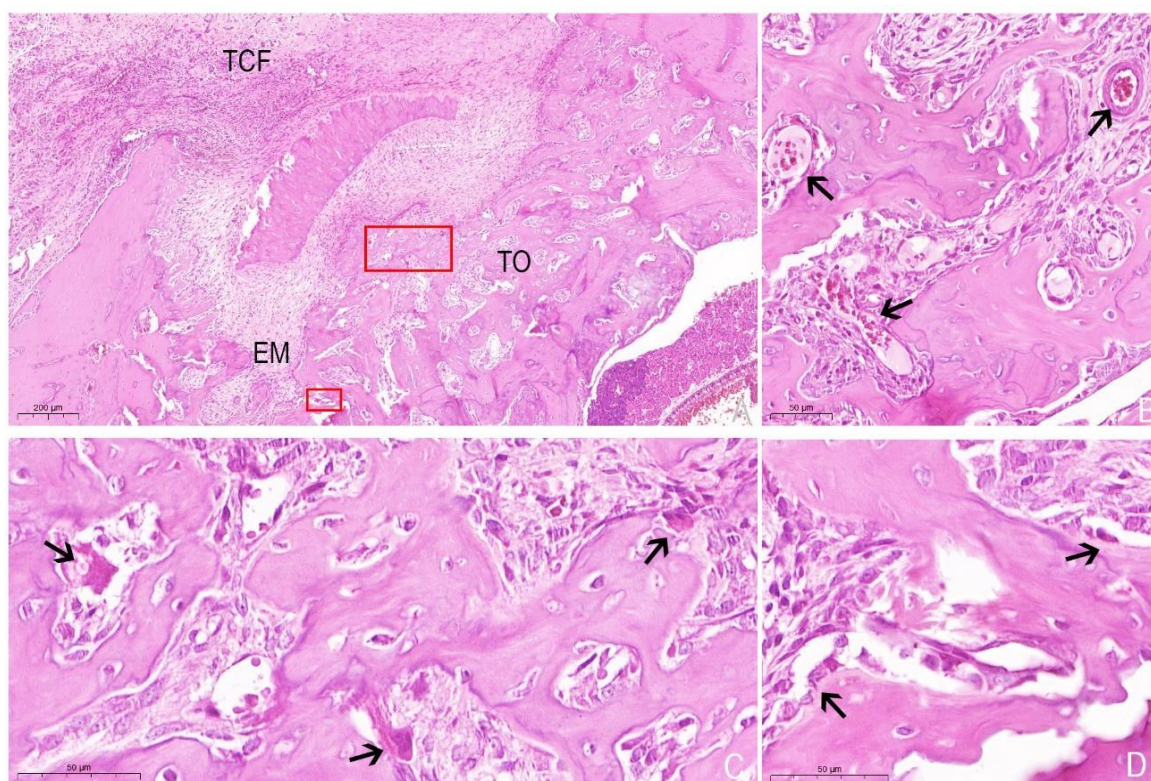
Legenda: A) Grupo tratado com DHCZ B) Grupo tratado com HCZ C) Grupo controle-coágulo D) Grupo tratado com MODB

Fonte: próprio autor

Grupo DHCZ Período de 14 dias:

A avaliação histológica do osso alveolar foi realizada por coloração H&E em microscopia de luz. Nas lâminas do Grupo tratado com cimento com doxiciclina (DHCZ) após 14 dias (FIGURA 12) observou-se uma área de tecido conjuntivo frouxo propriamente dito. As áreas subjacentes mostraram trabéculas ósseas neoformadas e os defeitos ósseos foram preenchidos por nova matriz óssea, exibindo espaços medulares, por vezes amplos, com a presença de vasos sanguíneos. Osteoclastos foram observados de forma localizada. Houve presença de restos do biomaterial, ainda assim, o cimento foi degradado de forma intensa e foi verificada ampla integração do mesmo com os tecidos adjacentes.

Figura 12 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com DHCZ por coloração H&E.



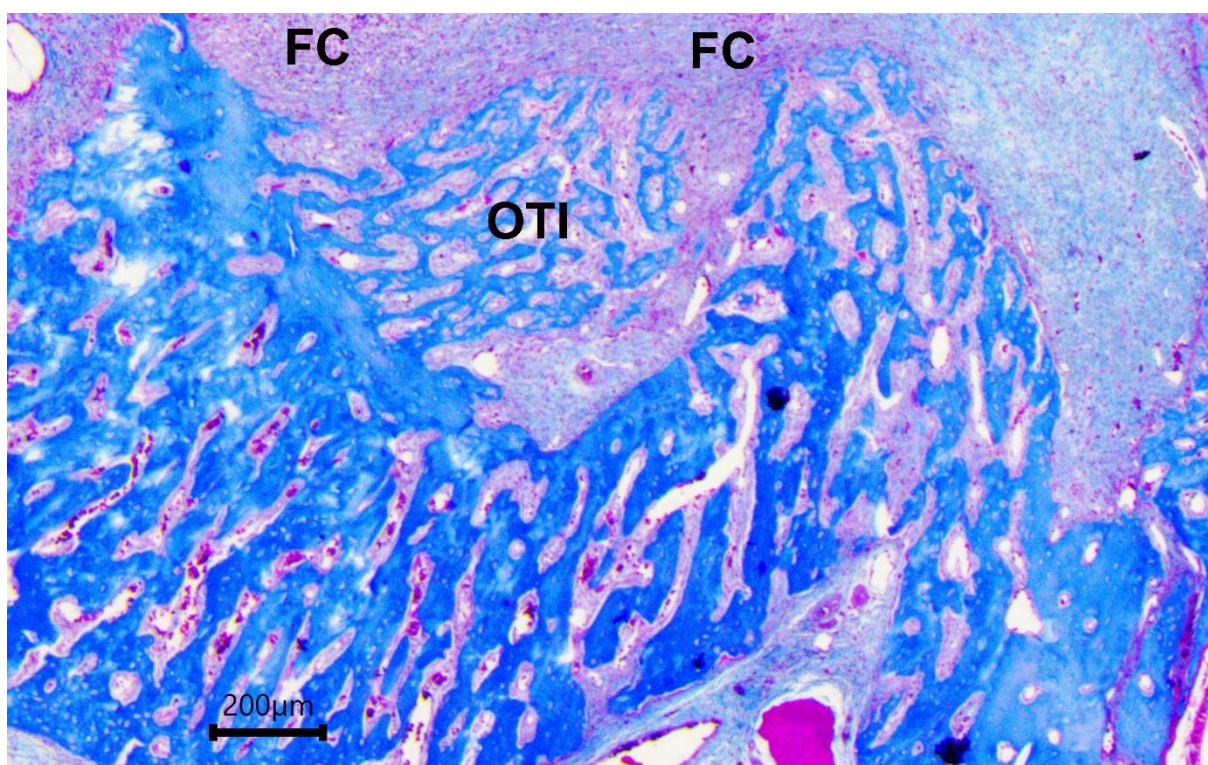
Legenda: A) A imagem mostra trabéculas ósseas neoformadas (TO). As trabéculas se fundem com outras e têm um trajeto irregular. Entre trabéculas observa-se formação de espaços medulares (EM) de diferentes tamanhos. Na parte superior nota-se tecido conjuntivo frouxo (TCF). B)

Presença de vasos sanguíneos de diferentes tamanhos dentro de espaços medulares. C) observa-se osteoclastos (as setas) D) Osteócitos no interior das trabéculas envolvidos por matriz óssea encontra-se dispersos regularmente um dos outros. Um grande número de células dispostas em fileiras, colocadas na superfície das trabéculas ósseas, osteoblastos achatados (as setas).

Fonte: Próprio autor

Nas lâminas coradas com Tricrômio de Masson do Grupo tratado com cimento com doxiciclina (DHCZ) após 14 dias (FIGURA 13) evidenciou-se a formação osso imaturo recém-formado tingido de cor azul, bem como presença abundante de fibras colágenas organizadas e vasos sanguíneos de estrutura normal (não dilatados).

Figura 13 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com DHCZ por coloração tricrômica de Masson



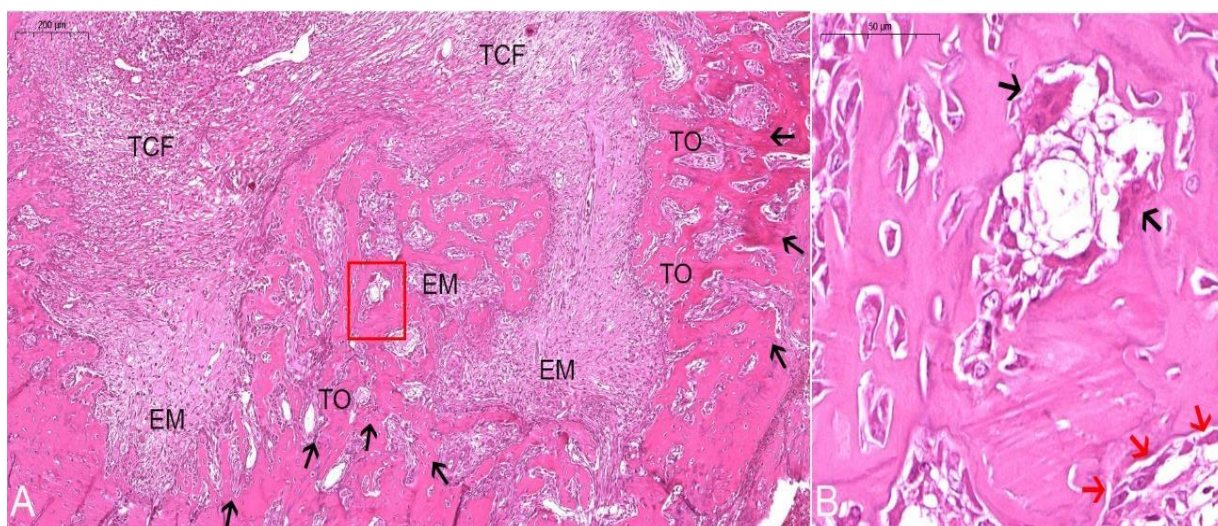
Legenda: Fibras colágenas (FC) organizadas (azul claro) na parte superior, o osso trabecular imaturo neoformado (OTI) (azul).

Fonte: Próprio autor

Grupo HCZ período 14 dias:

A avaliação histológica do osso alveolar foi realizada por coloração H&E em microscopia de luz. Na lâmina do grupo tratado com cimento sem doxiciclina (HCZ) após 14 dias (FIGURA 14) houve neoformação óssea no defeito, visto sob a forma de trabéculas ósseas, na qual podem ser observadas células multinucleadas localizadas, as trabéculas ósseas formam espaços medulares amplos com presença de vasos sanguíneos. O cimento apresentou uma degradação intensa, integrando se bem com tecido ósseo remanente.

Figura 14 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com cimento sem doxiciclina HCZ por coloração H&E

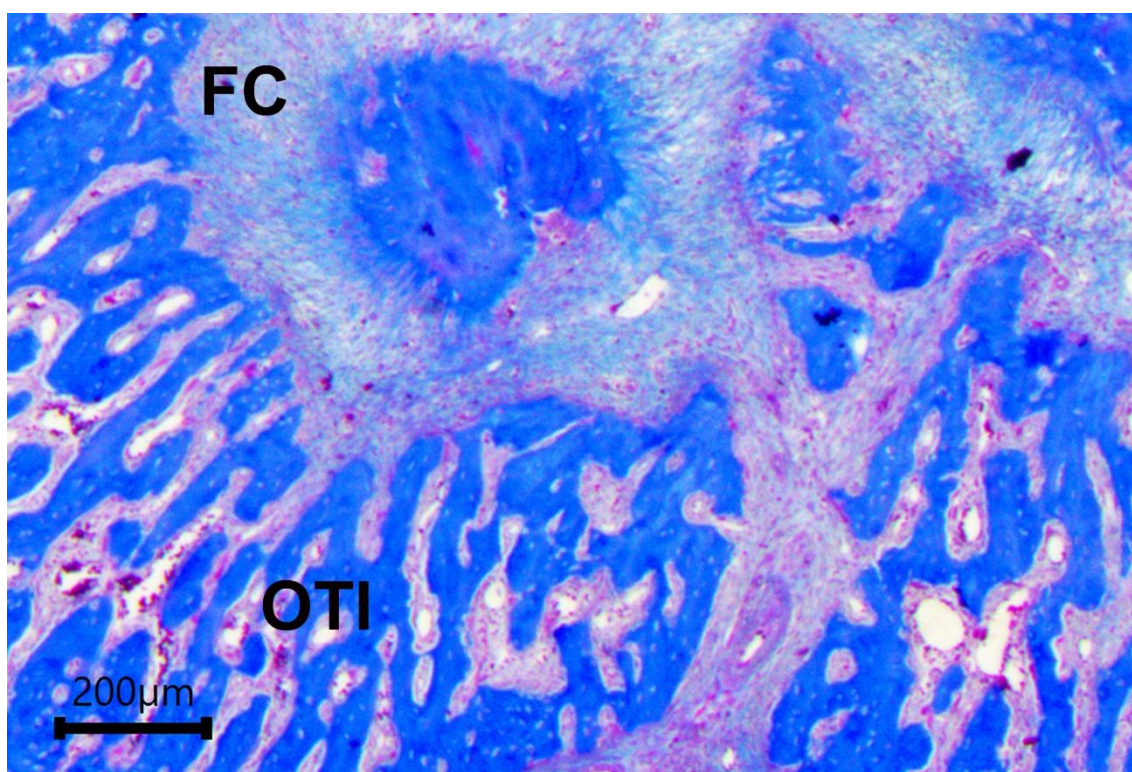


Legenda: A) A imagem mostra tecido ósseo neoformado em direção central do defeito visto sob a forma de trabéculas ósseas (TO) (as setas indicam o início do osso neoformado). As trabéculas ósseas se fundem com outras e têm um trajeto irregular. Tem uma grande quantidade de osteócitos no interior das trabéculas envolvidas por matriz óssea, espaços medulares amplos foram notados (EM). Na parte superior há presença tecido conjuntivo propriamente dito frouxo (TCF) 6.2x do caseviewer. B) Remodelação óssea na superfície externa de um local da trabécula por osteoclastos (as setas pretas indicam os osteoclastos), na superfície da trabécula foram notados osteoblastos achatados (as setas vermelhas indicam osteoblastos).

Fonte: Próprio autor.

Nas lâminas coradas com Tricrômio de Masson do Grupo tratado com cimento sem doxiciclina (HCZ) após 14 dias (FIGURA 15) evidenciou a formação osso imaturo tingido de cor azul, bem como presença abundante de fibras colágenas em diversas direções.

Figura 15 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com cimento sem doxiciclina HCZ por coloração tricrômica de Masson



Legenda: Fibras colágenas (FC) (azul claro) ao redor das trabéculas ósseas imaturo (OTI) (azul) se dispõem em muitas direções, sem nenhuma organização específica.

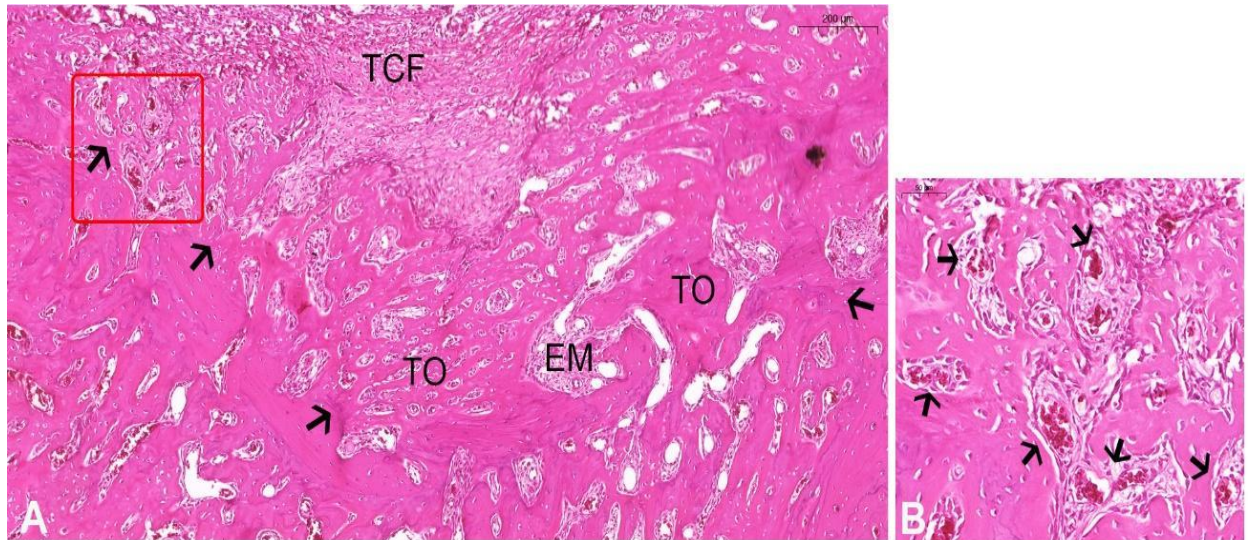
Fonte: Próprio autor

Grupo controle- coágulo T14 dias:

A avaliação histológica do osso alveolar foi realizada por coloração H&E em microscopia de luz. Nas lâminas do grupo controle após 14 dias (FIGURA 16) mostraram tecido ósseo neoformado na direção central do defeito, com formação de trabéculas ósseas que exibiam espaços medulares abundantes e amplos que teriam

aspecto do osso esponjoso, além disso contém abundantemente vasos e células sanguíneas. Não mostrou presença de infiltrado inflamatório.

Figura 16 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 14 dias sem tratamento (coágulo) por coloração H&E

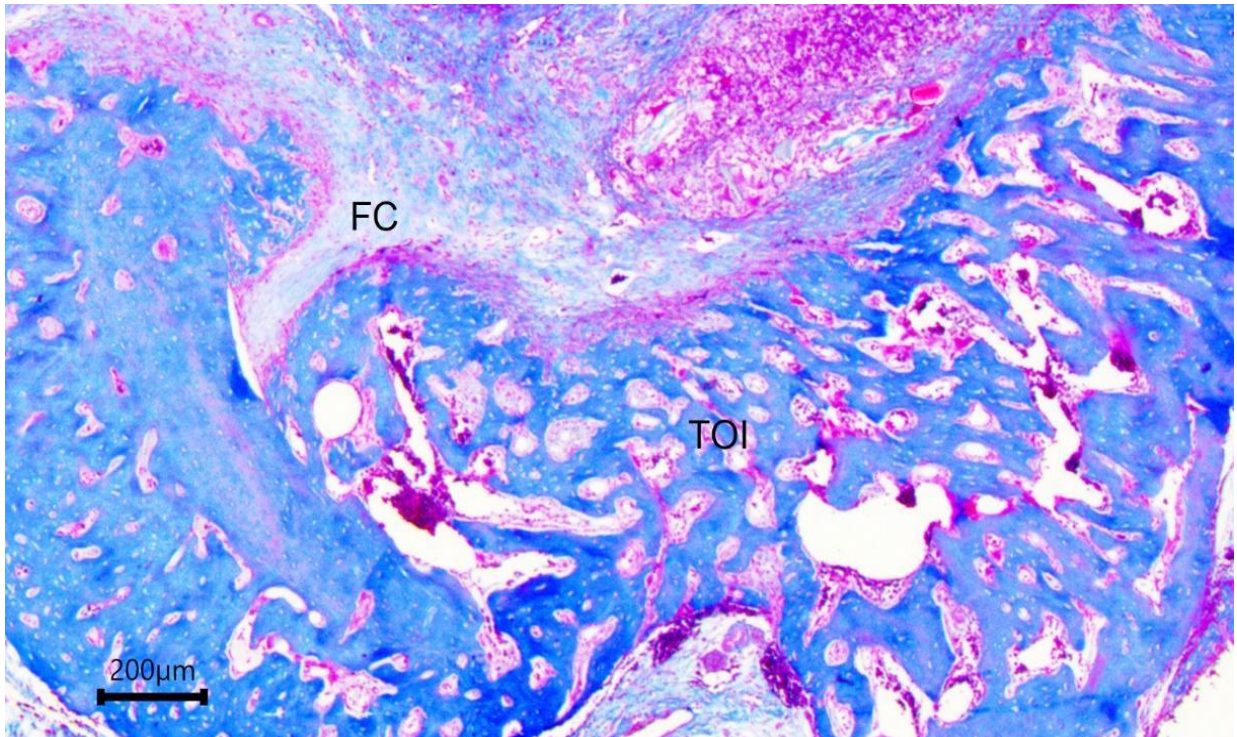


Legenda: A) A imagem mostra na parte superior tecido conjuntivo frouxo (TCF). Houve abundante formação de osso formando trabéculas ósseas (**TO**) (as setas indicam o início da neoformação óssea) em direção central. As trabéculas se fundem com outras e têm um trajeto irregular e entre elas tem formação de espaços medulares (EM) de diâmetros pequenos com formação de uma rede de vasos sanguíneos, B) Presença de abundantes vasos sanguíneos dentro dos espaços medulares.

Fonte: Próprio autor.

Nas lâminas coradas com Tricrômio de Masson do Grupo controle após 14 dias (FIGURA 17) evidenciou-se a formação osso imaturo tingido de cor azul, bem como presença de fibras colágenas organizadas.

Figura 17 - Aspectos histológicos da formação de osso novo alveolar após 14 dias sem tratamento (coágulo), por coloração tricrômica de Masson



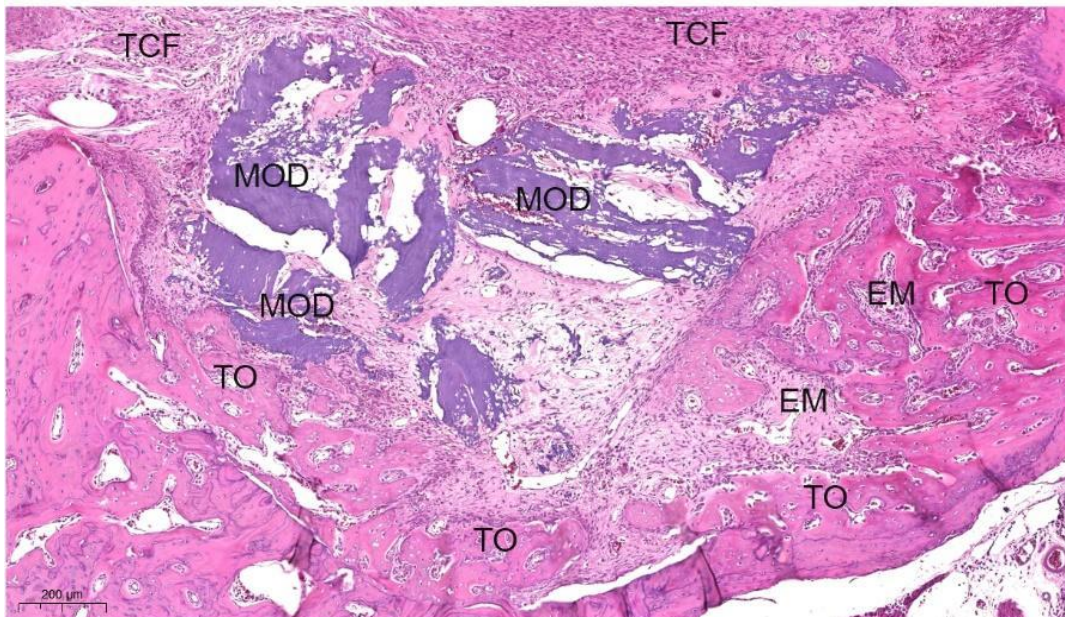
Legenda: Defeito ósseo preenchido por osso trabecular imaturo (OTI) neoformado (azul), fibras colágenas (FC) se encontram em pequena quantidade de forma localizada e organizadas (azul claro) na parte superior esquerda.

Fonte: Próprio autor.

Grupo MODB período 14 dias:

A avaliação histológica do osso alveolar foi realizada por coloração H&E em microscopia de luz. Nas lâminas do grupo tratado com matriz óssea desmineralizada (enxerto) após 14 dias T1 (FIGURA 18) mostraram a presença do biomaterial no defeito ósseo, nota-se boa continuidade e integração do biomaterial com os tecidos adjacentes. Não foram observados processos inflamatórios, a formação óssea se apresentou nas bordas laterais com pouca formação de vasos sanguíneos. O osso se apresentou sob forma de trabéculas e não foram evidenciadas células multinucleadas.

Figura 18 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com MODB, por coloração H&E

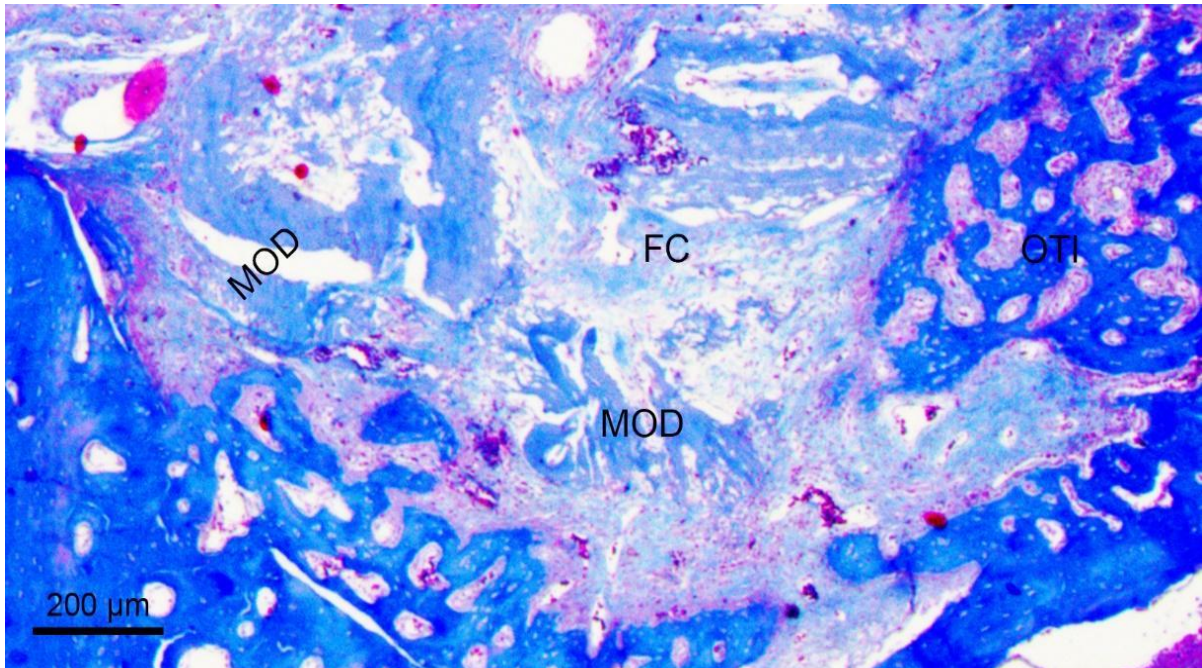


Legenda: Espaço do defeito foi preenchido por matriz óssea desmineralizada (MOD) enxerto ósseo na região central, com tecido conjuntivo frouxo acima da MOD. As trabéculas ósseas neoformadas (TO) estão limitando lateralmente o defeito, os espaços medulares (EM) têm um tamanho pequeno. Há pouca formação de vasos sanguíneos.

Fonte: Próprio autor.

Nas lâminas coradas com Tricrômio de Masson do grupo controle após 14 dias (FIGURA 19) houve formação osso imaturo tingido de cor azul, bem como presença de poucas de fibras colágenas.

Figura 19 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 14 dias de tratamento com MODB, por coloração tricrômica de Masson



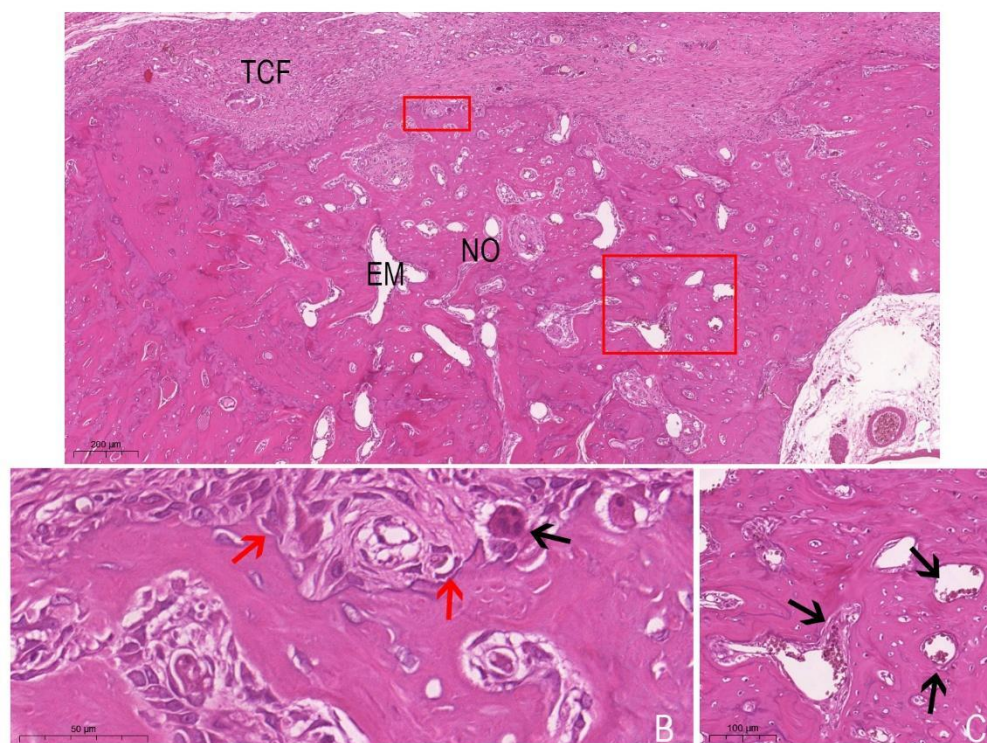
Legenda: Pouca presença de fibras colágenas (FC) (azul claro) localizadas no centro do defeito ocupado na sua maioria por enxerto ósseo (MOD), o osso é trabecular imaturo (OTI) neoformado (azul).

Fonte: Próprio autor

Grupo DHCZ período T 28 dias:

A avaliação histológica do osso alveolar foi realizada por coloração H&E em microscopia de luz. Nas lâminas do grupo tratado com cimento com doxiciclina (DHCZ) após 28 dias (FIGURA 20) o defeito foi preenchido por osso neoformado apresentando uma matriz óssea com características lamelar na qual os osteócitos residiam em cavidades mais ovaladas de menor tamanho do que o grupo de DHCZ 14 dias, foi possível observar células multinucleadas. Os espaços medulares exibiram vasos sanguíneos. Neste tempo a degradação foi total, sem a presença de formação de tecido fibroso. Não foram observados processos inflamatórios.

Figura 20 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com DHCZ com a coloração H&E

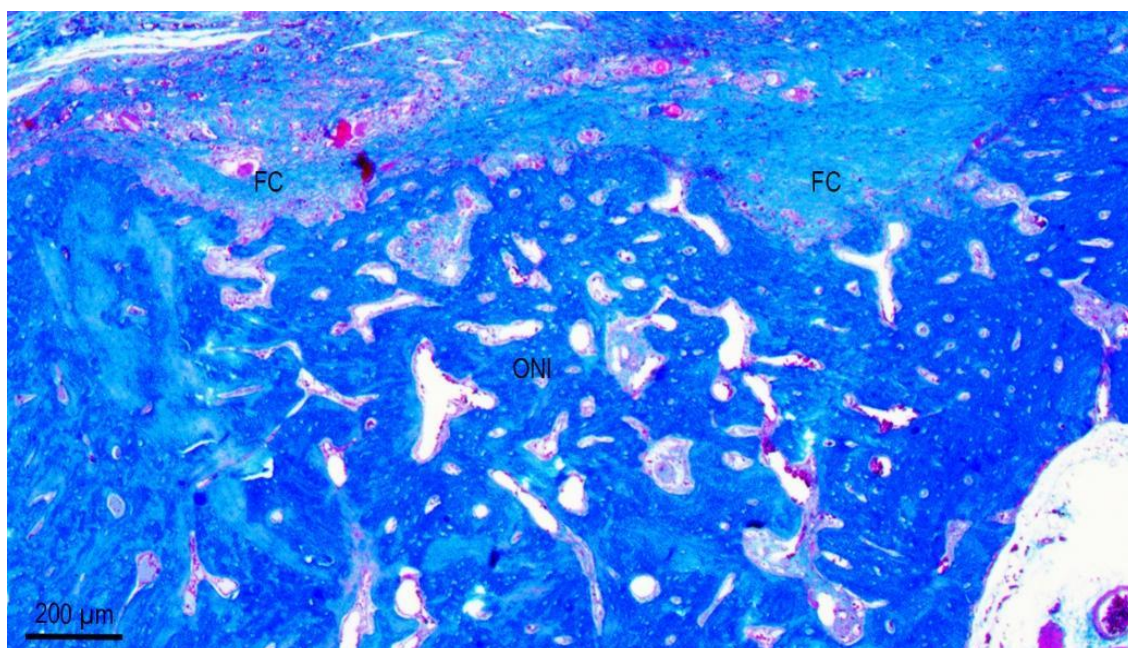


Legenda: A) A imagem mostra neoformação óssea (NO) preenchendo o defeito ósseo, característica de osso trabecular. As trabéculas têm um trajeto irregular e entre elas formam espaços medulares (EM) de diferentes tamanhos. Não se observa a presença de biomaterial, nem processos inflamatórios. Na parte superior há presença de tecido conjuntivo frouxo (TCF). B) Células responsáveis na modelagem e remodelagem óssea, osteoblastos (indicadas pelas setas vermelhas) e osteoclastos (indicada pela seta preta) os osteócitos se encontram no interior das trabéculas envolvidas por matriz óssea. C) Presença de vasos sanguíneos nos espaços medulares.

Fonte: Próprio autor

Nas lâminas coradas com Tricrômio de Masson do grupo tratado com cimento com doxiciclina (DHCZ), após 28 dias (FIGURA 21) evidenciou-se a formação osso imaturo recém-formado tingido de cor azul, bem como presença abundante de fibras colágenas organizadas.

Figura 21 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com DHCZ por coloração tricrômica de Masson



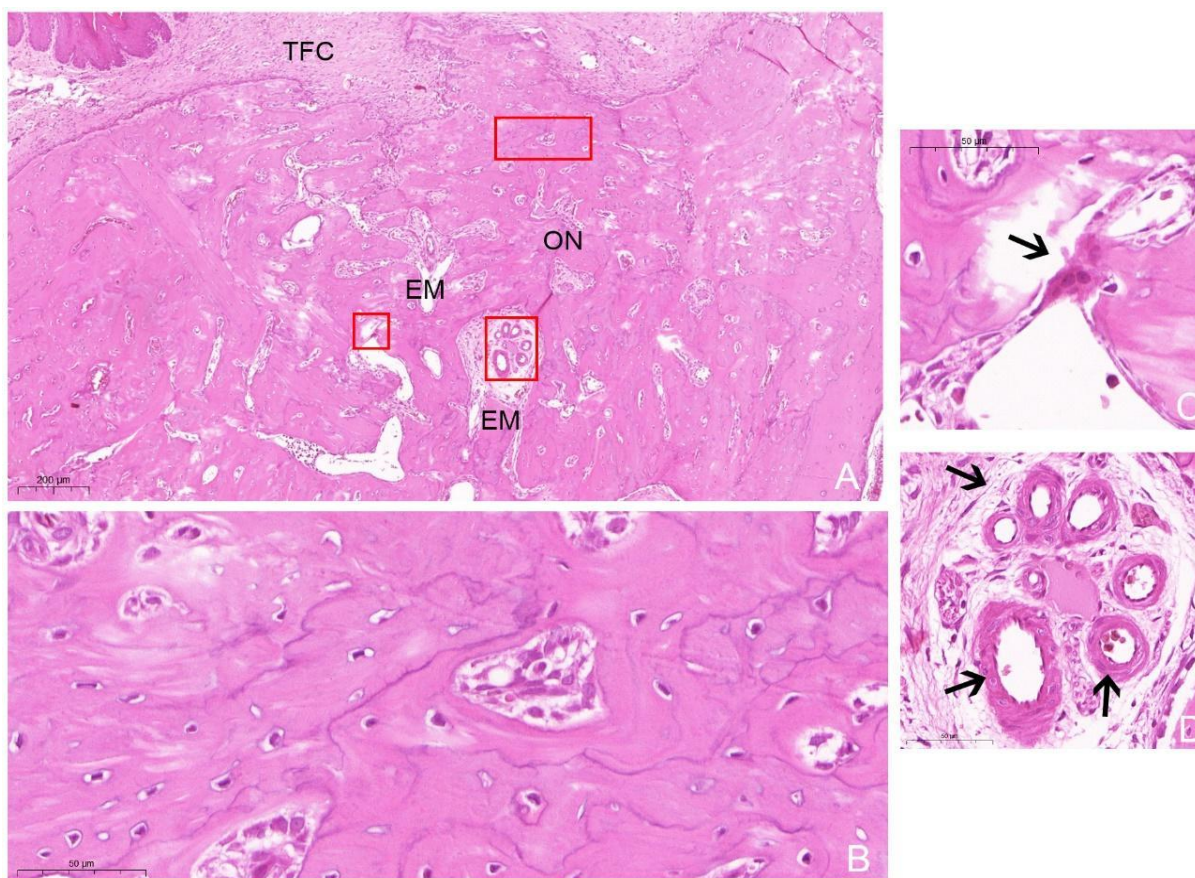
Legenda: Fibras colágenas (FC) organizadas horizontalmente (azul claro) na parte superior, o osso neoformado maduro (ONI) (azul).

Fonte: Próprio autor

Grupo HCZ período 28 dias:

A avaliação histológica do osso alveolar foi realizada por coloração H&E em microscopia de luz. Nas lâminas do Grupo tratado com cimento sem doxiciclina (HCZ) após 28 dias (FIGURA 22) foi observado que o defeito foi preenchido por osso neoformado. A matriz óssea teve presença de células multinucleadas. Os espaços medulares tiveram aspecto do osso esponjoso e exibiam vasos sanguíneos. O cimento foi degradado quase totalmente e não houve a presença de formação de tecido fibroso. Não foram observados processos inflamatórios.

Figura 22 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com cimento sem doxiciclina HCZ por coloração H&E

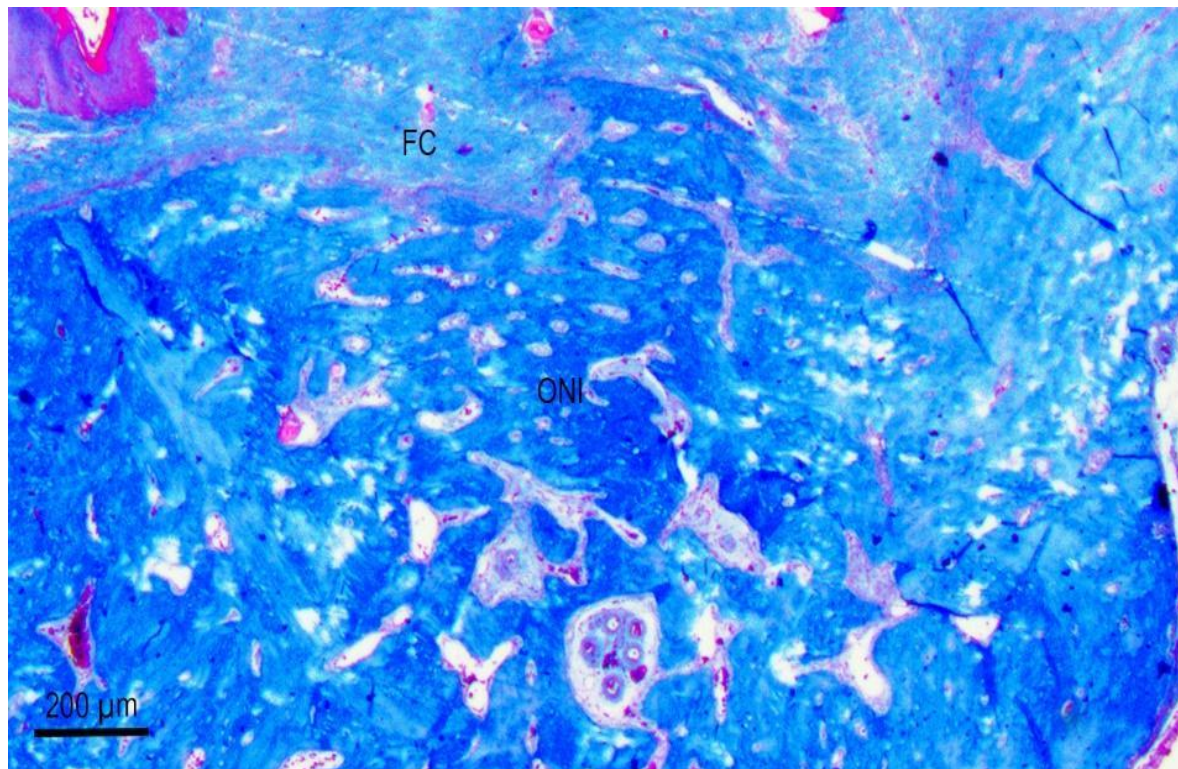


Legenda: A) A imagem mostra defeito preenchido com osso neoformado (ON) com características trabecular apresentando espaços medulares (EM), por vezes, amplos. Não se nota presença de biomaterial, nem processos inflamatórios, na parte superior é observado tecido conjuntivo propriamente dito frouxo (TCF). B) Osteócitos situados em pequenas cavidades da matriz extracelular. C) Superfície externa da trabécula exibindo osteoclastos (a seta preta). D) Espaço medular com múltiplos vasos sanguíneos (as setas).

Fonte: Próprio autor

As lâminas coradas com Tricrômio de Masson do grupo tratado com cimento sem doxiciclina (HCZ) após 28 dias (FIGURA 23) onde é evidenciada a formação de osso imaturo tingido de cor azul, bem como presença abundante de fibras colágenas.

Figura 23 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com cimento sem doxiciclina HCZ por coloração tricrômica de Masson



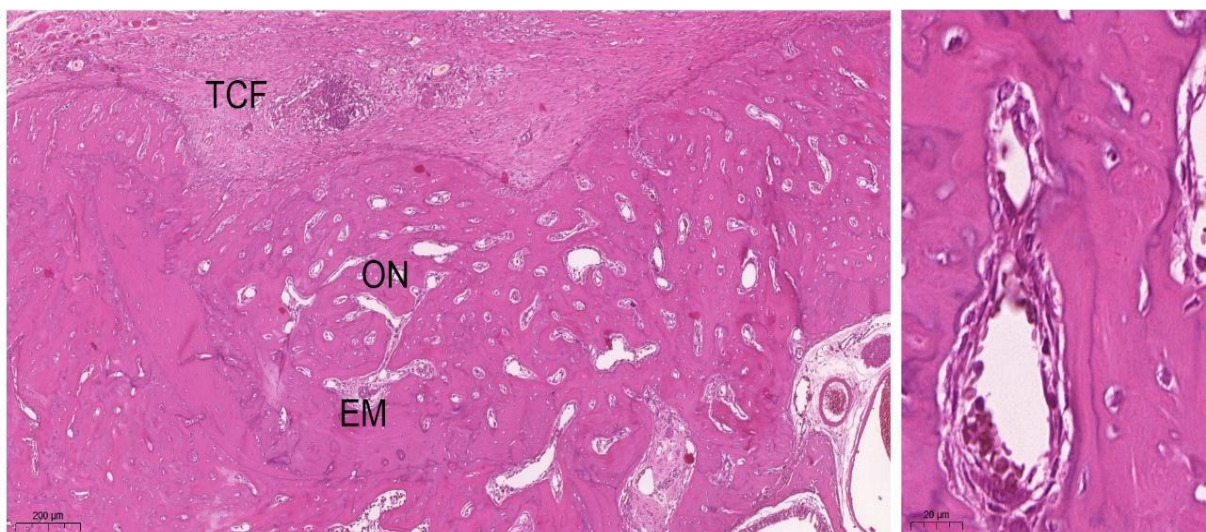
Legenda: Defeito preenchido com osso neoformado imaturo (ONI) (azul), poucas fibras colágenas (FC) (azul claro) se encontram na parte superior e se dispõem em direção horizontal.

Fonte: Próprio autor

Grupo controle-coágulo T2:

A avaliação histológica do osso alveolar foi realizada por coloração H&E em microscopia de luz. As lâminas do grupo controle após 28 dias (FIGURA 24) mostraram tecido ósseo neoformado com formação de trabéculas ósseas que exibiam espaços medulares abundantes e presença de vasos sanguíneos. Não mostrou presença de infiltrado inflamatório.

Figura 24 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 28 dias, sem tratamento (coágulo) por coloração H&E

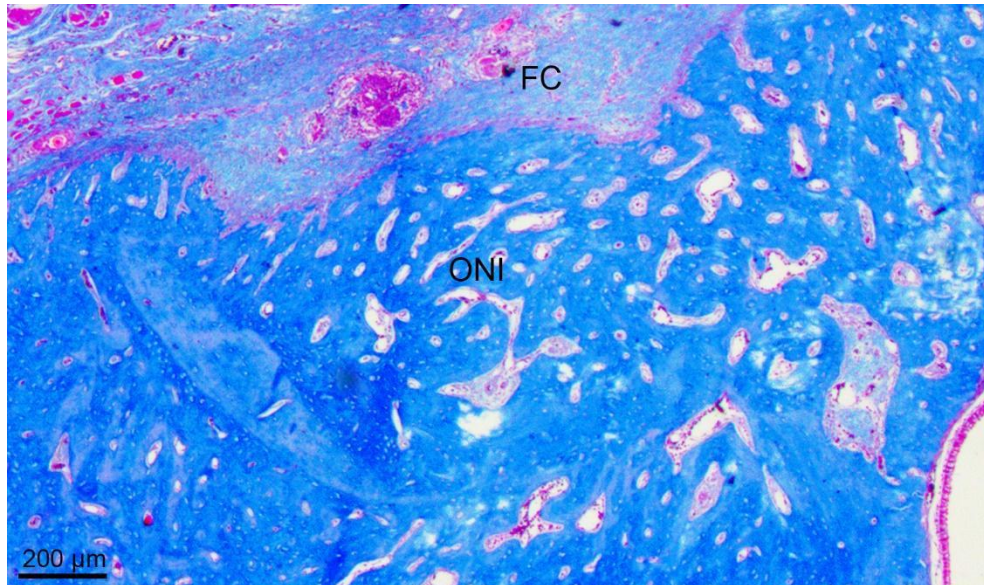


Legenda: A) A imagem mostra na parte superior tecido conjuntivo frouxo (TCF). Há presença de abundante ósseo neoformado (ON) preenchendo o defeito. Sistema de trabéculas formando espaços medulares (EM). B) Presença de vasos sanguíneos dentro dos espaços medulares.

Fonte: Próprio autor

Nas lâminas coradas com Tricrômio de Masson do grupo controle após 28 dias (FIGURA 25) houve a formação de osso imaturo tingido de cor azul, bem como presença de fibras colágenas organizadas.

Figura 25 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 28 dias sem tratamento (coágulo), por coloração tricrômica de Masson



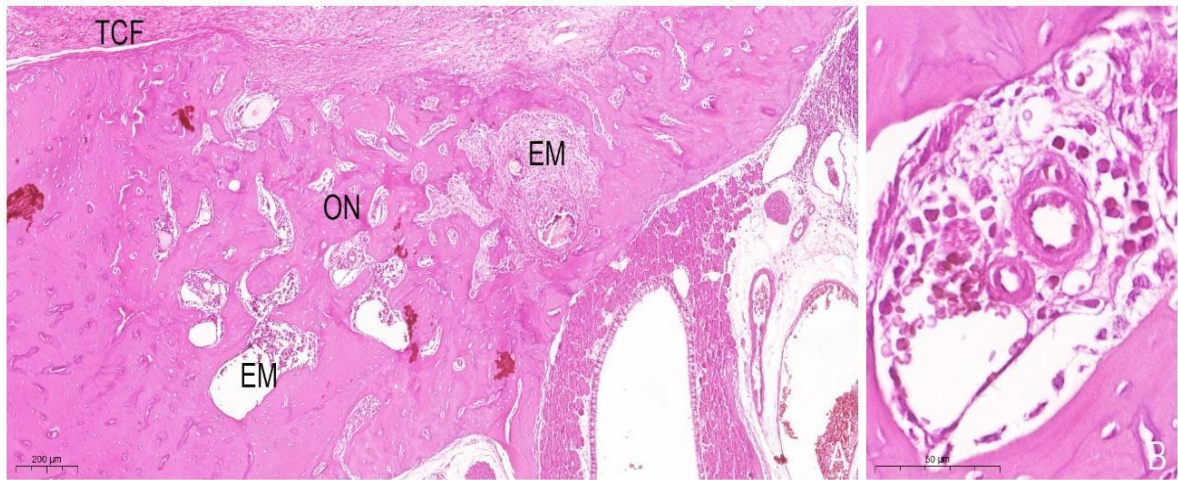
Legenda: Defeito ósseo preenchido ósseo neoformado imaturo (ONI) (azul), fibras colágenas (FC) se encontra em pequenas quantidades de forma localizada e organizadas horizontalmente (azul claro) na parte superior.

Fonte: Próprio autor

Grupo MODB T 28 dias:

A avaliação histológica do osso alveolar foi realizada por coloração H&E em microscopia de luz. Nas lâminas do Grupo tratado com matriz óssea desmineralizada (enxerto) após 28 dias (FIGURA 26) mostraram completa degradação do material também foi observada continuidade e integração do biomaterial com os tecidos adjacentes. Não foram observados processos inflamatórios. O defeito foi preenchido com osso neoformado e visto sob a forma de trabéculas ósseas que criaram espaços medulares amplos, com presença de vasos sanguíneos, não foram observadas células multinucleadas.

Figura 26 - Aspecto histológico da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com MODB, com a coloração H&E

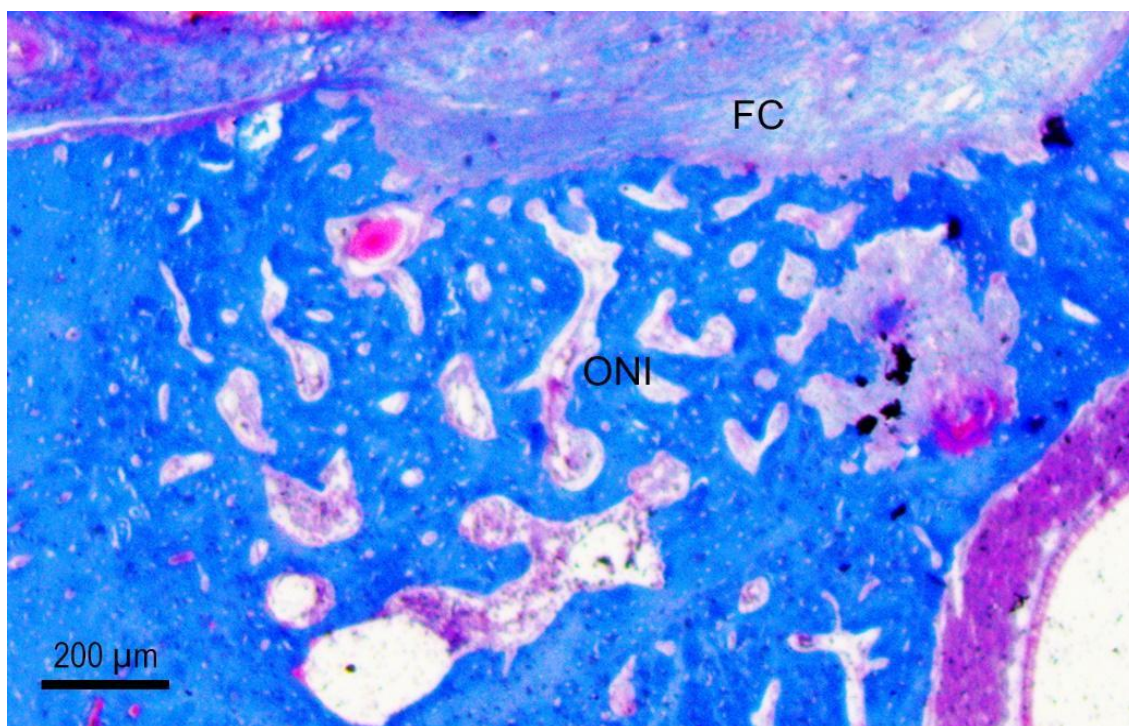


Legenda: A) Espaço do defeito foi preenchido por osso neoformado (ON), tendo uma degradação completa do enxerto, o osso neoformado apresenta características trabecular, com espaços medulares (EM) amplos com presença de vasos sanguíneos. B) Vasos sanguíneos de diferentes tamanhos presentes no espaço medular.

Fonte: Próprio autor

Nas lâminas coradas com Tricrômio de Masson do Grupo controle após 28 dias (FIGURA 27) evidenciou-se a formação osso imaturo tingido de cor azul, bem como presença de fibras colágenas.

Figura 27 - Aspectos histológicos da neoformação óssea alveolar após 28 dias de tratamento com MODB, na coloração tricrômica de Masson



Legenda: Pouca presença de fibras colágenas (**FC**) (azul claro) localizadas na parte superior do defeito, osso trabecular imaturo (**ONI**) (azul).

Fonte: Próprio autor.

5.4 Análise Histomorfométrica

As médias das áreas de neoformação óssea mensurada nos cortes na região do defeito em porcentagem estão apresentadas nas Tabelas 7 e 8. Os dados foram comparados intergrupos e intragrupo.

Tabela 7 - Mensuração da neoformação por grupo no tempo de 14 dias.

	GRUPOS	PORCENTAGEM	MÉDIA ± DP
HCZ	R1	16,3	38,9 ± 16,9
	R2	21,2	
	R3	40,4	
	R4	52,7	
	R5	58,8	
	R6	44	
DHCZ	R1	31,9	55,6 ± 15,8
	R2	76,7	
	R3	59,5	
	R4	65	
	R5	43,8	
	R6	56,6	
Controle	R1	42,4	53,9 ± 10,4
	R2	56,3	
	R3	62,9	
MODB	R1	59,5	52,2 ± 12,5
	R2	62,3	
	R3	52,7	
	R4	34,3	

Legenda: Dados descritivos em porcentagem e média ± desvio padrão da mensuração da área de neoformação por grupo no tempo de 14 dias.

Fonte: Próprio autor

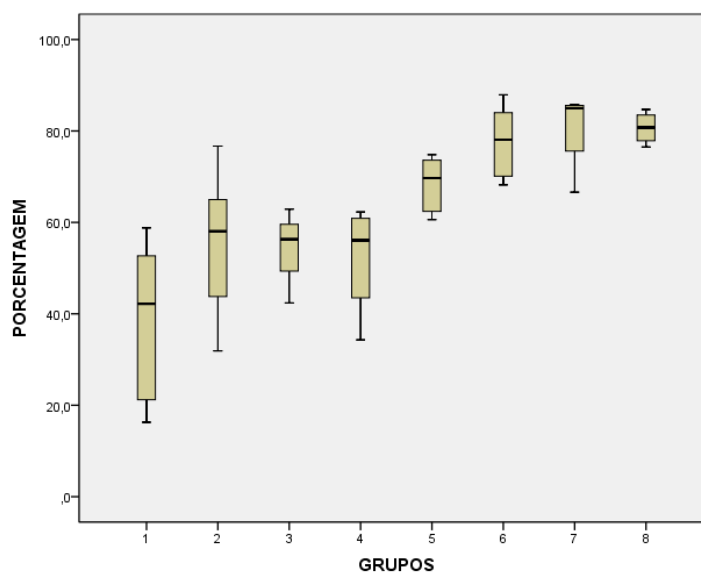
No período experimental de quatorze dias, a maior porcentagem média de osso novo foi observada para DHCZ (55,6%), mas foi muito semelhante com grupo controle (53,9%) e do enxerto (52,2%). No tanto no período de vinte oito dias os grupos com coágulo sanguíneo e enxerto apresentaram os melhores resultados (80,7% e 80,6% respectivamente). Não houve diferença estatística entre os grupos de tratamentos por tempo, assim como também não teve diferença entre um mesmo tratamento entre T1 e T2 (TABELA 11 e FIGURA 28), indicando que somente o cimento DHCZ aos 14 dias teve resultado similar aos demais grupos em T2. Os dados comparando todos os grupos de tratamento entre os diferentes tempos T1 e T2 mostraram diferenças estatísticas para DHCZ T2 e HCZ T1; controle T2 e HCZ T1; enxerto T2 e HCZ T1.

Tabela 8 - Mensuração da neoformação por grupo no tempo de 28 dias.

	GRUPOS	PORCENTAGEM	MÉDIA \pm DP
HCZ	R1	73,6	68,5 \pm 6,1
	R2	74,8	
	R3	60,6	
	R4	73,1	
	R5	66,3	
	R6	62,4	
DHCZ	R1	68,2	77,7 \pm 7,8
	R2	80,8	
	R3	75,4	
	R4	87,9	
	R5	70,1	
	R6	84	
Controle	R1	66,6	80,6 \pm 9,3
	R2	84,6	
	R3	85,4	
	R4	85,8	
MODB	R1	82,3	80,7 \pm 3,5
	R2	76,5	
	R3	79,2	
	R4	84,7	

Legenda: Dados descritivos, porcentagem média \pm desvio padrão da mensuração da área de neoformação óssea dos tratamentos no tempo de 28 dias

Figura 28 - Boxplot dos valores da área óssea trabéculas neoformadas da porcentagem nos diferentes grupos.



Legenda: O gráfico apresenta mediana, máximo e mínimo da porcentagem de preenchimento ósseo 1) HCZ T1, 2) DHCZ T1, 3) controle T1, 4) MODB T1, 5) HCZ T2, 6) DHCZ T2, 7) controle T2, 8) MODB T2

Tabela 9 - Análises estatística comparando os grupos dentro do mesmo tempo experimental

TEMPO 1		TEMPO 2	
GRUPOS tempo 1	P-VALOR	GRUPOS tempo 2	P-VALOR
HCZ - DHCZ	1.00	HCZ - DHCZ	1.00
HCZ - CONTROLE	1.00	HCZ - CONTROLE	1.00
DHCZ - CONTROLE	1.00	DHCZ - CONTROLE	1.00
HCZ - MOD	1.00	HCZ - MOD	1.00
MODB - CONTROLE	1.00	MODB - CONTROLE	1.00
MODB - DHCZ	1.00	MODB - DHCZ	1.00

Legenda: Análise bivariada (post-hoc teste Kruskal-Wallis) dos valores de preenchimento ósseo, comparando os tratamentos dentro do mesmo tempo experimental. * Nível de significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Análise estatístico comparando um grupo entre os tempos 1 e 2.

TEMPO 1 VS TEMPO 2							
Grupo	p-valor	Grupo	p-valor	Grupo	p-valor	Grupo	p-valor
HCZT1 - HCZT2	.468	DHCZT1 - DHCZT2	0.501	ControleT1 - ControleT2	.445	MODB T1 - MODB T2	.257

Legenda: Análise bivariada (post-hoc teste Kruskal-Wallis) dos valores de preenchimento ósseo, comparando o mesmo tratamento entre os tempos 1 e 2. * Nível de significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 11 - Análise estatístico comparando diferentes grupos entre os tempos 1 e 2.

Grupos	p-valor	Grupos	p-valor	Grupos	p-valor	Grupos	p-valor
HCZT1 - DHCZT2	.010*	DHCZT1 - HCZT2	1.00	ControleT1 - HCZT2	1.00	MODT1 - HCZT2	1.00
HCZT1 - ControleT2	.008*	DHCZT1 - ControleT2	.324	Controle T1 - DHCZT2	.716	MODT1 - DHCZT2	.303
HCZT1 - MODBT2	.013	DHCZT1 - MODBT2	.431	ControleT1 - MODBT2	.561	MODB T1 - ControleT2	.195

Legenda: Análise bivariada (post-hoc teste Kruskal-Wallis) dos valores de preenchimento ósseo, comparando diferentes grupos entre os tempos 1 e 2. * Nível de significância estatística ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Diversos biomateriais têm sido pesquisados e usados clinicamente em aplicações de reparo e/ou regeneração óssea, de forma isolada ou combinados entre eles. Dentre os exemplos podemos citar a matriz óssea desmineralizada Sindel *et al.* (2017), plasma rico em plaquetas Nakkeeran *et al.* (2019), combinação de cimento ósseos e fatores de crescimento (como proteína morfogenética óssea) Wang *et al.* (2019), sulfato de cálcio Das *et al.* (2019), cerâmicas de fosfato de cálcio, vidros bioativos Zamani *et al.* (2019) ou substitutos à base de polímeros (MUZZARELLI *et al.*, 2015).

O entendimento da interação da biologia celular e sua integração com os biomateriais induziram as inovações tecnológicas na bioengenharia de enxertos para que possam ser utilizados em diferentes aplicações clínicas (GUVEN *et al.*, 2015). Entretanto, o conhecimento adequado das propriedades, vantagens e desvantagens dos biomateriais ajuda na eleição correta para sua aplicação na regeneração de tecido.

A fim de explorar as aplicações clínicas potenciais de um biomaterial, diferentes estudos devem ser desenvolvidos. Um novo cimento odontológico foi preparado e caracterizado no laboratório de Biomateriais e Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Esse cimento odontológico à base de quitosana, nano-Hidroxiapatita, óxido de zinco nanoparticulado, com (DHCZ) e sem (HCZ) doxiciclina foi pesquisado para regeneração nervosa em células de linhagem HS-Sch-2 por Torquato (2020), demonstrando adequadas características físico-químicas, propriedades antibacterianas, assim como, biocompatibilidade celular e capacidade de estimular o crescimento de células de *Schwann*. Como agente biomineralizante dentário De Oliveira (2019) demonstrou em um estudo in vivo, o potencial de induzir biomineralização em lesões pulpares, onde as áreas mineralizadas na polpa dentária se estenderam além da zona da exposição.

Além da aplicação da quitosana, hidroxiapatita, óxido de zinco e Doxiciclina na regeneração de nervosa demonstrada por Torquato (2020), a literatura relata seu potencial para ser usado em regeneração de tecido ósseo. A regeneração de defeitos ósseos continua sendo um desafio e ainda falta uma solução ideal. A seleção de

materiais é um aspecto importante na hora de desenvolver de novos biomateriais com capacidade facilitar uma cicatrização rápida das feridas de restaurar a estrutura óssea.

Este trabalho propôs testar os efeitos dos cimentos odontológicos à base de quitosana, nano-hidroxiapatita, nanopartículas de óxido de zinco, com (DHCZ) e sem (HCZ) doxiciclina na regeneração óssea alveolar *in vivo*.

A quitosana é um biomaterial com excelente biocompatibilidade e capacidade antibacteriana, tem sido aplicada na engenharia de tecidos e reparo ósseo Zhou *et al.* (2017), apresenta baixa citotoxicidade para vários tipos de células e pode fornecer boa resistência aos biomateriais, além de inibir parcialmente a função dos osteoclastos e, portanto, reduz a reabsorção óssea (ROCHET *et al.*, 2009). Um estudo em coelhos, usando quitosana e fosfato beta-tricálcico (β -TCP) Azevedo *et al.* (2014) demonstraram que esse tratamento estimula a osteogênese. Além disso, a análise morfométrica mostrou que os grupos tratados com esses compósitos de quitosana incrementaram a formação óssea sendo estatisticamente significantes em comparação com o grupo controle.

A quitosana pode ser usada como quimio-atraente de macrófagos e neutrófilos para iniciar o processo de cicatrização Hu *et al.* (2003); estimular tecido de granulação e a reepitelização (UENO *et al.*, 1999). Também por sua capacidade de resposta anti-inflamatória. Fasolino *et al.* (2019) demonstraram *in vitro* que andaimes baseados em quitosana podem prevenir o início do processo inflamatório nas células tronco mesenquimais e um modelo de co-cultura baseado em macrófagos e osteoblastos estimulados pelo lipopolissacarídeo.

Para obter biomateriais mecanicamente mais rígidos, a quitosana pode ser incorporada com misturas de polímeros sintéticos e naturais, cerâmicas e materiais compósitos (USWATTA *et al.*, 2016). Dessa maneira, no presente estudo a quitosana também foi escolhida para ser utilizada e aumentar a rigidez do cimento junto ao óxido de zinco.

A hidroxiapatita é um dos biomateriais mais utilizados atualmente na prática clínica odontológica para reconstrução de defeitos ósseos periodontais, preenchimento de defeitos ósseos após cistectomia, apicectomia, perda de implantes

dentários e para aumento da espessura das cristas alveolares atroficas (PEPLA *et al.*, 2014).

No presente estudo sintetizou-se hidroxiapatita nanométrica mediante técnica de co-precipitação, não sinterizada. A hidroxiapatita nanométrica apresenta similaridade com o componente mineral ao osso (KATTIMANI *et al.*, 2016). Em condições fisiológicas, é a menos solúvel de todos os fosfatos de cálcio pelo qual apresenta uma maior estabilidade (Xu *et al.*, 2017). A HA apresenta melhor bioatividade e dissolução do que os cristais mais grossos ou sinterizados em altas temperaturas. HA sinterizada em altas temperaturas é uma cerâmica rígida, com o grande inconveniente de não se degradar facilmente ou completamente, esse fator depende do tipo de apatita formada (CHARRIÈRE *et al.*, 2003). Além disso, a literatura mostra que a adesão aos osteoblastos é fortemente influenciada pelo tamanho da superfície do material: uma diminuição no tamanho das partículas aumenta a adesão aos osteoblastos, diretamente relacionada à maior área superficial como apresentado por (SMOLEN *et al.*, 2013).

O ZnO no cimento tem papel biológico como estimulador no crescimento ósseo. No presente estudo o ZnO do cimento pode reagir com a fase líquida para liberar Zn^{2+} acelerando o reparo ósseo e facilitando a maturação das trabéculas ósseas. Isso está de acordo com os resultados obtidos em vários modelos experimentais de animais de outros estudos. Li *et al.* (2010) relataram resultados semelhantes com um cimento compósito HA / CS contendo ZnO, onde foi observada proeminente neoformação óssea. Além disso, o zinco estimula o crescimento ósseo e a mineralização óssea em ratos neonatos e induz a formação óssea em cultura de tecidos (YAMAGUCHI e EHARA, 1995). O zinco tem um efeito estimulador na proliferação de células osteoblásticas Hashizume e Yamaguchi, (1993) e um efeito inibidor na formação de células semelhantes a osteoclastos *in vitro* (KISHI e YAMAGUCHI, 1994).

A adição da doxiciclina em cimento ósseo tem sido pouco pesquisada, mesmo que demonstrando sua ação benéfica na regeneração de tecido ósseo. Em nosso estudo, avaliamos se a adição de doxiciclina no cimento odontológico DHCZ promove a formação óssea diante o seu homólogo sem doxiciclina HCZ. A DOX é um isômero estrutural da tetraciclina, usada em odontologia para tratamento da periodontite e peri-implantites Mercado *et al.* (2018), por apresentar características antibacteriana, anti-

inflamatória e imunossupressora. Sua atuação em baixas concentrações foi demonstrada *in vitro* ao ser capaz de estimular a proliferação de células para o crescimento ósseo (GOMES *et al.*, 2007). Além disso a DOX induz a apoptose de osteoclastos, modulando assim a reabsorção óssea, e tem capacidade de inibir metaloproteinases neutras dependentes de metal, especialmente collagenases e gelatinases (BETTANY *et al.*, 2000).

As collagenases são as responsáveis pela degradação dos tecidos conjuntivos e reabsorção óssea. Da mesma forma ao efeito anti collagenolítico da doxiciclina, que aumenta a capacidade de formação óssea por quimiotaxia de células osteoblásticas (Limirio, *et al.*, 2016). Tem sido demonstrado que o uso da Doxiciclina proporciona inúmeras características atraentes para materiais de enxertia. Kallala *et al.* (2012) relataram que as tetraciclina apresentam efeitos benéficos na regeneração óssea, em função do aumento da mineralização óssea.

No início do presente estudo a quantidade de DOX a ser utilizada para o cimento dentário DHCZ foi determinada com um estudo piloto, que consistiu na avaliação da histológica e histomorfométrica em duas concentrações 3 mg e 5 mg em dois tempos experimentais de 14 e 28 dias. Os resultados mostraram que cimento DHCZ contendo 5 mg apresentou melhor potencial de regeneração.

Em relação à regeneração óssea alveolar em ratos, tem sido relatados diferentes estudos para caracterizar o reparo ósseo em cavidades dentárias após extração de um incisivo Carmo *et al.* (2018), por conseguinte, sabe-se que aos 7 dias só tem a presença de coágulo sanguíneo na cavidade alveolar. Aos 14 dias pode ser detectado o osso trabecular em processo de maturação preenchendo grande parte da cavidade alveolar e que aos 28 dias, pode-se observar osso trabecular maduro preenchendo grande parte da cavidade alveolar (HASSUMI *et al.*, 2018). Da mesma forma para o reparo em defeitos ósseos preenchido com materiais sintéticos Koh *et al.*, (2018); Nguyen *et al.*, (2009), porém o uso de materiais para melhorar a neoformação óssea nos alvéolos imediatamente após a extração dentária parece atrasar o processo de reparo (BRANDÃO *et al.*, 2002).

Neste trabalho avaliamos principalmente o efeito do cimento dentário DHCZ e HCZ na neoformação óssea. Quando avaliamos a regeneração óssea do grupo tratado DHCZ comparado a HCZ, MODB e coágulo encontramos que aos 14 dias

houve uma maior porcentagem de formação de tecido ósseo no grupo tratado com cimento DHCZ ao passo que atingiu níveis de preenchimento ósseo similares aos encontrados em todos os grupos no T2. Diversos fatores contribuíram para esse resultado dentre eles a inibição da infecção que permite a deposição de matriz mineralizada. Esses achados poderiam estar associados às propriedades do DOX, na inibição de osteoclastogênese e na indução da apoptose dos osteoclastos na inibição de enzimas colagenolíticas, porém não houve diferença entre o grupo controle e do MODB. No entanto, quando comparando DHCZ com HCZ a diferença foi significativamente maior. Esses resultados indicam que HCZ tem propriedade de incidir neoformação óssea e que o uso de DOX aumentou a capacidade de cicatrização. Os resultados estão de acordo com os relatados na literatura Lucateli *et al.* (2018) no qual pesquisou a utilização de doxiciclina (DOX) na forma de gel demonstrando uma melhora significativa para o reparo de defeitos de tamanho crítico em ratos.

Na avaliação histomométrica de 28 dias foram observados que a neoformação óssea entre os cimentos odontológicos foi maior para DHCZ (77%) do que HCZ (68%), provavelmente esse resultado segue sendo atribuível às características presentes na doxiciclina, porém o grupo preenchido com MODB teve uma maior neoformação óssea (80%) sendo similar à porcentagem de neoformação óssea do grupo controle-coágulo (81%). Kattimani *et al.* (2019) concluíram em uma metanálise que os enxertos de hidroxiapatita como enxertos alveolares comparados ao controle são melhores em termos de preservação da altura e largura óssea existentes, além de mostrarem que a regeneração óssea é bem-sucedida com menos componente do tecido conjuntivo. No entanto, os resultados do presente estudo divergem com Kattimani *et al.*, (2019) enquanto a sua avaliação histomorfométrica mostra boa regeneração óssea associada aos enxertos de hidroxiapatita do que ao enxerto xenógeno.

No presente estudo a presa dos cimentos DHCZ e HCZ consistiu num sistema de polimerização gerada pela composição de um iniciador de polimerização, o persulfato de potássio (KPS) e um acelerador de polimerização (TEMED), reagindo com o macro monômero PEG. Este difere do sistema PMMA onde a substância N, N-dimetil-p-toluidina (DMpT) presente no líquido ativa o catalisador de Peróxido de benzoílo presente no pó, e no CPC os fosfatos de cálcio presente no pó reagem com o líquido, que pode ser água destilada.

No presente cimento a hidroxiapatita foi incorporada e nos cimentos CPC a formação da hidroxiapatita é realizada *in vivo* pela dissolução de íons. Essa dissolução fornece íons Ca e P, que precipitam na forma de cristais de HA (BURGUERA *et al.*, 2004). Ken *et al.* (2018) relataram que durante a análise de DRX, o cimento forma adicionalmente octacálcio fosfato (OCP). Sabe-se que essa é uma fase precursora à HA já que o OPC nucleia, cresce mais rápido e sua formação é cineticamente mais favorável que HA sob certas condições (JOHNSON e NANCOLLAS, 1992). No entanto a incorporação de HA direta na fase de pó evita a formação de impurezas como no cimento ósseo. Tem-se demonstrado que a adição de doxiciclina nos CPCs durante a síntese pode interferir *in vitro* na reação de precipitação de apatitas e inibir a mineralização, além disso, afeta as propriedades do cimento devido à capacidade desse antibiótico de quelar os íons Ca (KAITILA, 1971). Assim ressalta-se a inibição dessa possibilidade ao adicionar a doxiciclina na preparação do cimento e não durante a síntese.

Além disso, a presa do CPC poderia ser influenciada pela presença do fármaco. Como sistema de liberação controlada de fármacos a interação entre doxiciclina-CPCs durante presa poderia ter efeito nas propriedades físico-químicas em termos de nano e microporosidade, causando uma diminuição do tamanho dos poros, e uma alteração na cinética de liberação do fármaco, além de aumentar o risco de gerar resistência ao antibiótico a qual acontece em função da concentração utilizada (CANAL *et al.*, 2014).

Sabe-se que o zinco inibe a formação de cristais, o crescimento de HA e a transformação de fosfato de cálcio amorfo em HA (REN *et al.*, 2009). Horiuchi *et al.*, (2014) relataram no estudo que o crescimento de cristal de HA foi atrasado com o aumento do conteúdo de ZnO. No presente estudo a estratégia da adição do zinco foi durante a preparação do cimento e não durante a síntese da hidroxiapatita, como foi relatado na literatura, mostrou um impacto positivo porque permitiu um efeito na resposta tecidual sem afetar a estrutura da hidroxiapatita.

Contudo, existem também as dificuldades inerentes para trabalhar em modelo de pequenos animais e é um desafio constante na pesquisa para o operador. Por outro lado, a exclusão de amostra por apresentar resto radicular deve ser considerada sempre na hora o cálculo amostral. A execução do procedimento requer habilidade na operação e manipulação da técnica com relação ao reduzido tamanho de campo de

trabalho, concordando com Kim *et al.* (2013), os autores relataram que devido à pequena abertura da boca de um rato, é difícil abordar a região oral, no entanto este modelo permite avaliar o desempenho do biomaterial representando condições *in situ* como a microbiota, e a mastigação.

Finalmente, baseados nos dados obtidos podemos afirmar que embora o modelo animal estudado é o que mais se aproxima da realidade clínica nas exodontias ainda mais estudos serão necessários para conhecer se os suportes mecânicos propiciam ambiente ideal e degradação em produtos não-tóxicos que são removidos pelo organismo.

Em estudos atuais os resultados histomorfométricos são geralmente feitos mediante microCT, provavelmente pelos dados que se obtém e o número de número de artigo publicados. Análises imunohistoquímicas são necessárias para determinar a influência da doxíciclina no tratamento como também nas respostas moleculares.

Além disso, será necessário realizar pesquisas experimentais adicionais para validar o uso clínico deste material no futuro.

7 Conclusão

Os cimentos dentários DHCZ e HCZ têm capacidade ostecondutora para estimular a regeneração óssea visando à obtenção de um material com as características ideais para induzir o reparo de defeitos ósseos alveolares. Baseado nos resultados obtidos é possível afirmar que o material proposto, DHCZ, mostrou excelente osteocondutividade ao longo do período de implantação sendo especialmente vantajoso após 14 dias do reparo, sustentando o processo de regeneração.

REFERÊNCIAS

- AHAMED, M. et al. ZnO nanorod-induced apoptosis in human alveolar adenocarcinoma cells via p53, survivin and bax/bcl-2 pathways: Role of oxidative stress. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, n. 6, p. 904–913, 2011.
- AL-SANABANI, J. S.; MADFA, A. A.; AL-SANABANI, F. A. Application of Calcium Phosphate Materials in Dentistry. **International Journal of Biomaterials**, v. 2013, n. February, p. 1–12, 2013.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, v. 10, p. S96–S101, 1 out. 2001.
- AMBARD, A. J.; MUENINGHOFF, L. Calcium phosphate cement: Review of mechanical and biological properties. **Journal of Prosthodontics**, v. 15, n. 5, p. 321–328, 2006.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 667–681, 2000.
- ARORA, M. et al. Polymethylmethacrylate bone cements and additives: A review of the literature. **World Journal of Orthopedics**, v. 4, n. 2, p. 67–74, 2013.
- ASGHARI, F. et al. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 185–192, 2017.
- AZEVEDO, A. S. et al. Use of chitosan and β -tricalcium phosphate, alone and in combination, for bone healing in rabbits. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 2, p. 481–486, 2014.
- AZI, M. L. et al. Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2016.
- BALDWIN, P. et al. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 33, n. 4, p. 203–213, abr. 2019.
- BETTANY, J. T. et al. Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. **Bone**, v. 27, n. 1, p. 75–80, 2000.
- BISTOLFI et al. PMMA-Based Bone Cements and the Problem of Joint Arthroplasty Infections: Status and New Perspectives. **Materials**, v. 12, n. 23, p. 4002, 2 dez. 2019.

BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A. Bone tissue engineering using 3D printing. **Materials Today**, v. 16, n. 12, p. 496–504, 2013.

BRANDÃO, A. C. et al. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. **Brazilian dental journal**, v. 13, n. 3, p. 147–154, 2002.

BUNACIU, A. A.; UDRIȘTIOIU, E. GABRIELA; ABOUL-ENEIN, H. Y. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 289–299, 2 out. 2015.

BURGUERA, E. F.; GUITIÁN, F.; CHOW, L. C. A water setting tetracalcium phosphate-dicalcium phosphate dihydrate cement. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 71, n. 2, p. 275–282, 2004.

CABBAD, N. C. et al. Autogenous Bone Cranioplasty. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 143, n. 6, p. 1713–1723, jun. 2019.

CALABRESE, G. et al. Bone augmentation after ectopic implantation of a cell-free collagen-hydroxyapatite scaffold in the mouse. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–10, 2016.

CANAL, C. et al. Relevance of microstructure for the early antibiotic release of fresh and pre-set calcium phosphate cements. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 9, p. 8403–8412, 2013.

CARMO, A. B. X. DO et al. Alveolar bone repair with strontium- containing nanostructured carbonated hydroxyapatite. **Journal of Applied Oral Science**, v. 26, p. 1–9, 18 jan. 2018.

CARSON, J. S.; BOSTROM, M. P. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. **Injury**, v. 38, n. 1, p. S33–S37, mar. 2007.

CATLEDGE, S. A. et al. Nanostructured Ceramics for Biomedical Implants. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 2, n. 3, p. 293–312, 1 jul. 2002.

CHARRIÈRE, E.; LEMAITRE, J.; ZYSSET, P. Hydroxyapatite cement scaffolds with controlled macroporosity: fabrication protocol and mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, n. 5, p. 809–817, fev. 2003.

CHEN, X. et al. Osteoblast–osteoclast interactions. **Connective Tissue Research**, v. 59, n. 2, p. 99–107, 2018.

Cortes Maria E; PAULA, G. C.; Sinisterra, Rubén Dario; Oliveira, C. C. B.; Cerchar, R. A. F.; Gala-Garcia A. Composições cimentantes para regeneração óssea, biomineralização dentinária e estimulação de tecido nervoso, e uso, 2020. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: **Patente de Invenção**. Número do registro: BR102020010552. Data de depósito: 26/05/2020. Depositante/Titular: Maria Esperanza Cortés Segura, Rubén Dario Sinisterra. Depositante/Titular: Fundação de

Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais

COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita : Obtenção , caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, p. 29–38, 2009.

CROCKETT, J. C. et al. Bone remodelling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 7, p. 991–998, 1 abr. 2011.

D'ELÍA, N. L. et al. Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, n.11, p.5014–5026, 2013.

DALEY, E. et al. Characterization of doxycycline-loaded calcium phosphate cement: implications for treatment of aneurysmal bone cysts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 7, 2018.

DALLAS, S. L.; PRIDEAUX, M.; BONEWALD, L. F. The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 5, p. 658–690, 1 out. 2013.

DAS, E. et al. Calcium sulfate-based bioactive cement for periodontal regeneration: An in Vitro study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 30, n. 4, p. 558–567, 2019.
DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 5, p. 577–587, 14 mar. 2008.

De Oliveira C. Avaliação de um cimento experimental a base de hidroxiapatita nanoparticulada no complexo dentino-pulpar. 2019. **Dissertação** (Odontologia) - Universidade Federal de Minas Gerais

DOMINGOS, M. et al. Three-dimensional printed bone scaffolds: The role of nano/micro-hydroxyapatite particles on the adhesion and differentiation of human mesenchymal stem cells. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 231, n. 6, p. 555–564, 5 jun. 2017.

DOROZHKIN, S. V. Acta Biomaterialia Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 715–734, 2010.

DRAENERT, F. G. et al. Vertical bone augmentation procedures: Basics and techniques in dental implantology. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 5, p. 1605–1613, maio 2014.

DU, B. et al. Angiogenesis and bone regeneration of porous nano-hydroxyapatite/coralline blocks coated with rhVEGF165in critical-size alveolar bone defects in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 2555–2565, 2015.

DUTTA, S. R. et al. Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. **Irish Journal of Medical Science**, v. 184, n. 1, p. 101–106, 2015.

- ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. **Materials**, v. 10, n. 4, p. 334, 24 mar. 2017.
- ENGSTRAND, J.; PERSSON, C.; ENGQVIST, H. Influence of polymer addition on the mechanical properties of a premixed calcium phosphate cement. **Biomatter**, v. 3, n. 4, p. 1–7, 2013.
- FANG, C. H. et al. The chitosan/tri-calcium phosphate bio-composite bone cement promotes better osteo-integration: An in vitro and in vivo study. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2019.
- FASOLINO, I. et al. Osteoinductive and anti-inflammatory properties of chitosan-based scaffolds for bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 105, n. April, 2019.
- FELICE, B. et al. Controlled degradability of PCL-ZnO nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering and their antibacterial activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 93, n. March, p. 724–738, dez. 2018.
- FILLINGHAM, Y.; JACOBS, J. Bone grafts and their substitutes. **Bone and Joint Journal**, v. 98B, n. 1, p. 6–9, 2016.
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.
- FRANCO, G. C. N. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and in vivo. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 10, p. 1454–1464, jun. 2011.
- FREED, L. E. et al. Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. **Nature Biotechnology**, v. 12, n. 7, p. 689–693, 1 jul. 1994.
- GALA-GARCIA, A. et al. Hybrid nanofibers based on poly-caprolactone / gelatin / hydroxyapatite nanoparticles-loaded Doxycycline : Effective anti-tumoral and antibacterial activity **Materials Science & Engineering C Hybrid nano fibers based on poly-caprolactone / gelatin / hydro. Materials Science & Engineering C**, v. 83, n. April, p. 25–34, 2018.
- GARCÍA-GARETA, E.; COATHUP, M. J.; BLUNN, G. W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. **Bone**, v. 81, p. 112–121, dez. 2015.
- GARINO, N. et al. Zinc oxide nanocrystals as a nanoantibiotic and osteoinductive agent. **RSC Advances**, v. 9, n. 20, p. 11312–11321, 2019.
- GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36 Suppl 3, p. 20–27, 2005.

GINEBRA, M.-P.; MONTUFAR, E. B. 9 - Cements as bone repair materials. In: PAWELEC, K. M.; PLANELL, J. A. B. T.-B. R. B. (SECOND E. (Eds.). . **Woodhead Publishing Series in Biomaterials**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2019. p. 233–271.

GOLUB, L. M. et al. Subantimicrobial-Dose Doxycycline Modulates Gingival Crevicular Fluid Biomarkers of Periodontitis in Postmenopausal Osteopenic Women. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1409–1418, ago. 2008.

GUO, H. et al. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 268–278, jan. 2009.

GUVEN, S. et al. Multiscale assembly for tissue engineering and regenerative medicine. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 269–279, maio 2015.

HASHIZUME, M.; YAMAGUCHI, M. Stimulatory effect of β -alanyl-L-histidinato zinc on cell proliferation is dependent on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 122, n. 1, p. 59–64, 1993.

HASSUMI, J. S. et al. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. **Journal of Applied Oral Science**, v.26, p.1–12, 18 jun 2018

HE, Z. et al. Bone cements for percutaneous vertebroplasty and balloon kyphoplasty: Current status and future developments. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 3, n. 1, p. 1–11, jan. 2015.

HEDBERG, E. L. et al. Controlled release of an osteogenic peptide from injectable biodegradable polymeric composites. **Journal of Controlled Release**, v. 84, n. 3, p. 137–150, dez. 2002.

HENG, B. C. et al. Cytotoxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles is influenced by cell density and culture format. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 6, p. 695–704, 2011.

HESARAKI, S.; NEZAFATI, N. In vitro biocompatibility of chitosan/hyaluronic acid-containing calcium phosphate bone cements. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 8, p. 1507–1516, 2014.

HORIUCHI, S. et al. Fabrications of zinc-releasing biocement combining zinc calcium phosphate to calcium phosphate cement. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 29, p. 151–160, 2014.

HU, S.-G.; JOU, C.-H.; YANG, M. . Protein adsorption, fibroblast activity and antibacterial properties of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) grafted with chitosan and chito oligosaccharide after immobilized with hyaluronic acid. **Biomaterials**, v. 24, n. 16, p. 2685–2693, jul. 2003.

HUBER, F. X. et al. Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste Ostim in comparison to Alpha-BSM - more bone ingrowth inside the implanted material with Ostim compared to Alpha BSM. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 10, p. 164, 2009.

JANG, S. J. et al. **Bone regeneration of hydroxyapatite with granular form or porous scaffold in canine alveolar sockets** *In Vivo*, 2017.

JEONG, J. et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. **Biomaterials Research**, v. 23, n. 1, p. 1–11, 2019.

JIANG, J.; PI, J.; CAI, J. The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications[1] J. Jiang, J. Pi, and J. Cai, “The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications,” vol. 2018, 2018. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2018, p. 18, 2018.

JOHNSSON, M. S. A.; NANCOLLAS, G. H. The role of Brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 3, n. 1–2, p. 61–82, 1992.

JONES, A. C. et al. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. **Biomaterials**, v. 28, p. 2491–2504, 2007.

JULIEN, M. et al. Physico-chemical-mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates. **Biomaterials**, v. 28, n. 6, p. 956–965, 2007.

KAITILA, I. The mechanism by which tetracycline hydrochloride inhibits mineralization in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 244, n. 3, p. 584–594, set. 1971.

KALLALA, R. et al. In vitro and in vivo effects of antibiotics on bone cell metabolism and fracture healing. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 11, n. 1, p. 15–32, 12 jan. 2012.

KANG, T. et al. In vitro toxicity of different-sized ZnO nanoparticles in Caco-2 cells. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2013.

KARALASHVILI, L. et al. BONE GRAFTS FOR RECONSTRUCTION OF BONE DEFECTS (REVIEW). **Georgian medical news**, n. 282, p. 44–49, set. 2018.

KATTIMANI, V. S. et al. Role of Synthetic Hydroxyapatite-In Socket Preservation: A Systematic Review and Meta-analysis. **The journal of contemporary dental practice**, v. 20, n. 8, p. 987–993, 1 ago. 2019.

KATTIMANI, V. S.; KONDAKA, S.; LINGAMANENI, K. P. Hydroxyapatite — Past , Present , and Future in Bone Regeneration. **Bone and Tissue Regeneration Insights**, v. 7, p. 9–19, 2016.

KENT, J. N. et al. Hydroxylapatite blocks and particles as bone graft substitutes in orthognathic and reconstructive surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 8, p. 597–605, 1986.

KENT, N. W. et al. In vitro and in vivo study of commercial calcium phosphate cement HydroSet™. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 1, p. 21–30, jan. 2018.

KIM, J.-H. et al. A novel in vivo platform for studying alveolar bone regeneration in rat. **Journal of Tissue Engineering**, v. 4, p. 204173141351770, 2013.

KISANUKI, O. et al. Experimental study of calcium phosphate cement impregnated with dideoxy-kanamycin B. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 12, n. 3, p. 281–288, maio 2007.

KISHI, S.; YAMAGUCHI, M. Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, n. 6, p. 1225–1230, 1994.

KOH, K. S. et al. Bone regeneration using silk hydroxyapatite hybrid composite in a rat alveolar defect model. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 59–68, 2018.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, T. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. **Materials**, v. 7, n. 4, p. 2833–2881, 9 abr. 2014.

KUMAR, P.; FATHIMA, G.; VINITHA, B. Bone grafts in dentistry. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 125, 2013.

LAURENCIN, D. et al. Magnesium incorporation into hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1826–1837, mar. 2011.

LI, Q. et al. Demineralized bone matrix-based microcarrier scaffold favors vascularized large bone regeneration in vivo in a rat model. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 33, n. 2, p. 182–195, 27 ago. 2018.

LI, Z. et al. In vitro and in vivo evaluation on the bioactivity of ZnO containing nano-hydroxyapatite/chitosan cement. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 93, n. 1, p. 269–279, 2010.

LIAO, J. et al. Preparation, characterization and properties of nano-hydroxyapatite/polypropylene carbonate biocomposite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 63, p. 285–291, jun. 2016.

LIMIRIO, P. H. J. O. et al. The Effect of Local Delivery Doxycycline and Alendronate on Bone Repair. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 4, p. 872–877, 2016.

LIU, C. et al. Rheological properties of concentrated aqueous injectable calcium phosphate cement slurry. **Biomaterials**, v. 27, n. 29, p. 5003–5013, 2006.

LIU, Z. et al. Periodontal regeneration with stem cells-seeded collagen-hydroxyapatite scaffold. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 31, n. 1, p. 121–131, 2016.

LLOYD, A. W. Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. **Medical device technology**, v. 13, n. 1, p. 18–21, [s.d.].

LUCATELI, R. L. et al. Doxycycline and autogenous bone in repair of critical-size defects. **Implant Dentistry**, v. 27, n. 4, p. 461–466, 2018.

MADIHALLY, S. V.; MATTHEW, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 20, n. 12, p. 1133–1142, 1999.

MERCADO, F.; HAMLET, S.; IVANOVSKI, S. Regenerative surgical therapy for peri-implantitis using deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen, enamel matrix derivative and Doxycycline-A prospective 3-year cohort study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 29, n. 6, p. 583–591, jun. 2018.

MESTRES, G. et al. In vivo efficiency of antimicrobial inorganic bone grafts in osteomyelitis treatments. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, n. March 2018, p. 84–95, 2019.

MIRI, A. et al. Zinc oxide nanoparticles: Biosynthesis, characterization, antifungal and cytotoxic activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, n. June, p. 109981, nov. 2019.

MISHRA, P. K. et al. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 12, p. 1825–1834, 2017.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, v. 65, n. 15- 16 SPEC. ISS., p. 2385–2406, 2005.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone. **Marine Drugs**, v. 13, n. 12, p. 7314–7338, 2015.

NAIR, S. et al. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. SUPPL. 1, p. 235–241, 2009.

NAKKEERAN, K. P. et al. Evaluation of bone regeneration in periapical osseous defects with and without platelet rich plasma, combined calcium sulfate and autologous bone graft – A comparative study. **Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 120, n. 3, p. 196–202, jun. 2019.

NGUYEN, P. D. et al. Establishment of a Critical-Sized Alveolar Defect in the Rat: A Model for Human Gingivoperiosteoplasty. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 123, n. 3, p. 817–825, mar. 2009.

NYARY, T.; SCAMMELL, B. E. Principles of bone and joint injuries and their healing. **Surgery (United Kingdom)**, v. 36, n. 1, p. 7–14, 2018.

ONG, S. M.; TAYLOR, G. J. S. Doxycycline inhibits bone resorption by human interface membrane cells from aseptically loose hip replacements. **The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume**, v. 85-B, n. 3, p. 456–461, abr. 2003.

- ORYAN, A. et al. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 9, n. 1, p. 18, 2014.
- OTHMAN, Z. et al. The role of ENPP1/PC-1 in osteoinduction by calcium phosphate ceramics. **Biomaterials**, v. 210, p. 12–24, jul. 2019.
- PASTORINO, D.; CANAL, C.; GINEBRA, M.-P. Drug delivery from injectable calcium phosphate foams by tailoring the macroporosity–drug interaction. **Acta Biomaterialia**, v. 12, n. 1, p. 250–259, jan. 2015.
- PATEL, P. P. et al. Mechanical and biological evaluation of a hydroxyapatite-reinforced scaffold for bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, n. 4, p. 732–741, abr. 2019.
- PAYNE, J. B. et al. Subantimicrobial dose doxycycline effects on alveolar bone loss in post-menopausal women. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 34, n. 9, p. 776–787, set. 2007.
- PEPLA, E. et al. Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. **Annali di stomatologia**, v. 5, n. 3, p. 108–14, jul. 2014.
- PEREZ, R. A.; KIM, H.-W.; GINEBRA, M.-P. Polymeric additives to enhance the functional properties of calcium phosphate cements. **Journal of Tissue Engineering**, v. 3, n. 1, p. 204173141243955, 20 dez. 2012.
- PERIĆ KAČAREVIĆ, Ž. et al. An introduction to bone tissue engineering. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 43, n. 2, p. 69–86, 23 fev. 2020.
- POUNTOS, I. et al. The effect of antibiotics on bone healing: current evidence. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 10, n. 6, p. 935–945, 9 nov. 2011.
- PRAKASAM, M. et al. Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 4, p. 1099–1140, 21 dez. 2015.
- PUJALTÉ, I. et al. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 10, 2011.
- PUVVADA, N.; PANIGRAHI, P. K.; PATHAK, A. Room temperature synthesis of highly hemocompatible hydroxyapatite, study of their physical properties and spectroscopic correlation of particle size. **Nanoscale**, v. 2, n. 12, p. 2631, 2010.
- RATTANACHAN, S. T. et al. Development of injectable chitosan/biphasic calcium phosphate bone cement and in vitro and in vivo evaluation. **Biomedical Materials**, v. 15, n. 5, p. 055038, 8 set. 2020.

RAVI KUMAR, M. N. . A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, nov. 2000.

RAZAK, S. I. A.; SHARIF, N. F. A.; RAHMAN, W. A. A. Biodegradable Polymers and their Bone Applications : A Review. **International Journal of Engineering & Sciences**, v. 12, n. 1, p. 31–49, 2012.

REINHARDT, R. A. et al. Efficacy of sub-antimicrobial dose doxycycline in post-menopausal women: Clinical outcomes. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 34, n. 9, p. 768–775, 2007.

REININGER, D. et al. Complications in the use of the mandibular body, ramus and symphysis as donor sites in bone graft surgery. A systematic review. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, p. e241–e249, 2016.

REN, F. et al. Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 8, p. 3141–3149, 2009.

ROBERTS, T. T.; ROSENBAUM, A. J. Bone grafts , bone substitutes and orthobiologics The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. **Organogenesis**, v. 8, n. 4, p. 114–124, 2012.

RODEN, R. D. Principles of Bone Grafting. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 22, n. 3, p. 295–300, 2010.

SADAT-SHOJAI, M. et al. Acta Biomaterialia Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7591–7621, 2013.

SEMYARI, H. et al. Fabrication and characterization of collagen–hydroxyapatite-based composite scaffolds containing doxycycline via freeze-casting method for bone tissue engineering. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 33, n. 4, p. 501–513, 16 out. 2018.

SHEIKH, Z. et al. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. **Materials**, v. 8, n. 9, p. 5744–5794, 31 ago. 2015.

SHEIKH, Z. et al. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: A review. **Biomaterials Research**, v. 21, n. 1, p. 1–20, 2017.

SHETTY, V.; HAN, T. J. Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery. **Dental clinics of North America**, v. 35, n. 3, p. 521–30, jul. 1991.

SHIBUYA, N.; JUPITER, D. C. Bone Graft Substitute: Allograft and Xenograft. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 32, n. 1, p. 21–34, 2015.

SIDDIQI, K. S. et al. Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, n. 1, p. 141, 8 dez. 2018.

SILVA, A. C. et al. Effect of Doxycycline in Gel Form on Bone Regeneration: Histomorphometric and Tomographic Study in Rat Calvaria. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 1, p. 74–82, 2016.

SINDEL, A. et al. Histomorphometric Comparison of Bone Regeneration in Critical-Sized Bone Defects Using Demineralized Bone Matrix, Platelet-Rich Fibrin, and Hyaluronic Acid as Bone Substitutes. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 28, n. 7, p. 1865–1868, out. 2017.

SMOLEN, D. et al. Highly biocompatible , nanocrystalline hydroxyapatite synthesized in a solvothermal process driven by high energy density microwave radiation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 653–668, 2013.

SOCOL, G. et al. Hydroxyapatite thin films synthesized by pulsed laser deposition and magnetron sputtering on PMMA substrates for medical applications. **Materials Science & Engineering B**, v. 169, n. 1–3, p. 159–168, 2010.

SUÁREZ, D. F. et al. Efficient antibacterial nanosponges based on ZnO nanoparticles and doxycycline. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 177, n. October, p. 85–94, dez. 2017.

SUBRAMANIAM, S. et al. Hydroxyapatite-calcium sulfate-hyaluronic acid composite encapsulated with collagenase as bone substitute for alveolar bone regeneration. **Biomaterials**, v. 74, p. 99–108, jan. 2016.

SUKPAITA, T. et al. In Vivo Bone Regeneration Induced by a Scaffold of Chitosan/Dicarboxylic Acid Seeded with Human Periodontal Ligament Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4883, 1 out. 2019.

SWAIN, S. K.; SARKAR, D. A comparative study: Hydroxyapatite spherical nanopowders and elongated nanorods. **Ceramics International**, v. 37, n. 7, p. 2927–2930, 2011.

TAMIMI, F. et al. Doxycycline sustained release from brushite cements for the treatment of periodontal diseases. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 85, n. 3, p. 707–714, 2008.

Torquato GCP, Caracterização físico-química e biológica de um cimento dentário à base de quitosana, nano-hidroxiapatita, nanopartículas de óxido de zinco para estimulação de células nervosas de Schwann (HS-Sch-2). **Tese**. Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, Brasil. 148p defesa 21/07/2020

UENO, H. et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**, v. 20, n. 15, p. 1407–1414, ago. 1999.

USWATTA, S. P.; OKEKE, I. U.; JAYASURIYA, A. C. Injectable porous nano-hydroxyapatite/chitosan/tripolyphosphate scaffolds with improved compressive strength for bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 69, p. 505–512, dez. 2016.

- WALKER, L. C. et al. Microbial resistance related to antibiotic-loaded bone cement: a historical review. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 25, n. 12, p. 3808–3817, 12 dez. 2017.
- WAN, D. C.; NACAMULI, R. P.; LONGAKER, M. T. Craniofacial Bone Tissue Engineering. **Dental Clinics of North America**, v. 50, n. 2, p. 175–190, abr. 2006.
- WANG, B. et al. Application of BMP-Bone Cement and FGF-Gel on Periodontal Tissue Regeneration in Nonhuman Primates. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 25, n. 12, p. 748–756, 1 dez. 2019.
- WANG, P. et al. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells. **Bone Research**, v. 2, n. 1, p. 14017, 30 dez. 2014.
- WANG, W.; YEUNG, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. **Bioactive Materials**, v. 2, n. 4, p. 224–247, dez. 2017.
- WEBSTER, T. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. **Biomaterials**, v. 21, n. 17, p. 1803–1810, set. 2000.
- WEIR, M. D.; XU, H. H. K. Osteoblastic induction on calcium phosphate cement-chitosan constructs for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 94A, n. 1, p. 223–233, jul. 2010.
- WU, C. et al. A novel chemical route to prepare ZnO nanoparticles. **Materials Letters**, v. 60, n. 15, p. 1828–1832, jul. 2006.
- WUBNEH, A. et al. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 80, p. 1–30, out. 2018.
- XU, H. H. et al. Calcium phosphate cements for bone engineering and their biological properties. **Bone Research**, v. 5, n. 1, p. 17056, 20 dez. 2017.
- XU, H. H. K. et al. Processing and Properties of Strong and Non-rigid Calcium Phosphate Cement. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 3, p. 219–224, 20 mar. 2002.
- YAMADA, M.; EGUSA, H. Current bone substitutes for implant dentistry. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 62, n. 2, p. 152–161, 2018.
- YOUSEFI, A.-M. A review of calcium phosphate cements and acrylic bone cements as injectable materials for bone repair and implant fixation. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 17, n. 4, p. 228080001987259, 12 out. 2019.
- YU, L. et al. A Novel Injectable Calcium Phosphate Cement-Bioactive Glass Composite for Bone Regeneration. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e62570, 25 abr. 2013.
- ZAMANI, D.; MOZTARZADEH, F.; BIZARI, D. Alginate-bioactive glass containing Zn and Mg composite scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 1256–1267, set. 2019.

ZHANG, P.; DING, L.; KASUGAI, S. Effect of doxycycline doped bone substitute on vertical bone augmentation on rat calvaria. **Dental Materials Journal**, v. 38, n. 2, p. 211–217, 28 mar. 2019.

ZHANG, Z.-Y.; XIONG, H.-M. Photoluminescent ZnO Nanoparticles and Their Biological Applications. **Materials**, v. 8, n. 6, p. 3101–3127, 29 maio 2015.

ZHOU, D. et al. Comparative study of porous hydroxyapatite/chitosan and whitlockite/chitosan scaffolds for bone regeneration in calvarial defects. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 2673–2687, abr. 2017.

ZOR, F. et al. Biocompatibility in regenerative nanomedicine. **Nanomedicine**, v. 14, n. 20, p. 2763–2775, out. 2019.

ZWINGENBERGER, S. et al. Recommendations and Considerations for the Use of Biologics in Orthopedic Surgery. **BioDrugs**, v. 26, n. 4, p. 245–256, ago. 2012.

ANEXO A - Aprovação do CEUA/UFMG**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Protocolo CEUA: 349/2018

Título do projeto: Avaliação do potencial osteogênico do cimento de nanohidroxiapatita dopada com magnésio in vivo

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Maria Esperanza Cortes Segura

Unidade: Faculdade de Odontologia

Departamento: Departamento de Odontologia Restauradora

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 03/12/2018. Validade: 03/12/2018 à 02/12/2023

Belo Horizonte, 03/12/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: (31) 3409-4516

www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B - Pedido de Patente



26/05/2020 870200065167
18:11
29409161917819292

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 010552 3

Dados do Depositante (71)**Depositante 1 de 2**

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@cit.ufmg.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 26/05/2020 às 18:11, Peça 870200065167

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 21949888000183
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Órgão Público
Endereço: Av. José Cândido da Silveira, n. 1500, Bairro Horto
Cidade: Belo Horizonte
Estado: MG
CEP: 31035-536
País: BRASIL
Telefone: (31) 340 93932
Fax:
Email: patentes@cit.ufmg.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÕES CIMENTANTES PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA, BIOMINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA E ESTIMULAÇÃO DE TECIDO NERVOSO, E USO
Resumo: A presente tecnologia trata de composições cimentantes formadas por uma fase sólida composta por fosfato de cálcio, nanopartículas de hidroxiapatita, nanopartículas de óxido de zinco, polímeros naturais biodegradáveis como quitosana, agentes iniciadores de reação como o persulfato de hidrogênio, com a adição de um agente antimicrobiano da família da tetraciclina como a doxiciclina, além de uma fase líquida composta por tampão fosfato salino, agentes aceleradores de reação como a tetrametileno diamina e ao menos um excipiente como o polietilenoglicol. Essas composições cimentantes podem ser usadas em preparações para regeneração óssea, biomineralização dentinária e estimulação de tecido nervoso, levando ao aumento do efeito de biomineralização, osteogênese e neuroprotetor, em mais de duas vezes, quando comparado a seus compostos de partida de forma isolada, evitando aumentar a administração de substâncias tóxicas.
Figura a publicar: 10

Nome: RUBEN DARIO SINISTERRA MILLAN
CPF: 14300429820
Nacionalidade: Colombiana
Qualificação Fiel: Professor do ensino superior
Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
Cidade: Belo Horizonte
Estado: MG
CEP: 31270-901
País: BRASIL
Telefone: (31) 340 93932
Fax:
Email: patentes@ciit.ufmg.br

Inventor 4 de 8

Nome: CAIO CESAR BORGES DE OLIVEIRA
CPF: 09823929661
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Fiel: Pesquisador
Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
Cidade: Belo Horizonte
Estado: MG
CEP: 31270-901
País: BRASIL
Telefone: (31) 340 93932
Fax:
Email: patentes@ciit.ufmg.br

Inventor 5 de 8

Nome: RICHARD ALFONSO FILLS CERCHAR

CPF: 23935533802

Nacionalidade: Colombiana

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@cit.ufmg.br

Inventor 6 de 6

Nome: ALFONSO GALA-GARCÍA

CPF: 01607877694

Nacionalidade: Peruana

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@cit.ufmg.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 26/05/2020 às 18:11, Petição 870200065167