

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia

Guilherme Luz Campos

**AVALIAÇÃO DE CIMENTO DE HIDROXIAPATITA CARBONATADA:
*DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE***

Belo Horizonte
2024

Guilherme Luz Campos

**AVALIAÇÃO DE CIMENTO DE HIDROXIAPATITA CARBONATADA:
*DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE***

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés Segura

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Napier de Souza

Belo Horizonte
2024

Ficha Catalográfica

C198a Campos, Guilherme Luz.
2024 Avaliação de cimento de hidroxiapatita carbonatada:
T desenvolvimento, caracterização e citotoxicidade / Guilherme
Luz Campos. -- 2024.

84 f. : il.

Orientadora: Maria Esperanza Cortés Segura.
Coorientador: Leandro Napier de Souza.

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

1. Regeneração óssea. 2. Materiais biocompatíveis. 3.
Cimentos ósseos. I. Cortés Segura, Maria Esperanza. II.
Souza, Leandro Napier de. III. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DE CIMENTO DE HIDROXIAPATITA CARBONATADA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE

GUILHERME LUZ CAMPOS

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

Aprovada em 09 de julho de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Maria Esperanza Cortes Segura - Orientadora
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof. Leandro Napier de Souza
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof. Alfonso Gala Garcia
Universidade Federal da Bahia - UFB

Profa. Lidia Maria de Andrade
UFMG

Belo Horizonte, 09 de julho de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Napier de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 09/07/2024, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lidia Maria de Andrade, Usuário Externo**, em 09/07/2024, às 11:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Esperanza Cortes Segura, Professora do Magistério Superior**, em 09/07/2024, às 11:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alfonso Gala García, Usuário Externo**, em 09/07/2024, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3327993** e o código CRC **20D01C16**.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo amor incondicional e por sempre incentivar a busca pelo conhecimento. Aos meus irmãos pelo amor e presença em todas as fases da minha vida. À Priscilla, minha amada esposa, e minhas duas filhas, Maria Luísa e Maria Sofia, fontes de todo o meu amor e motivos para me tornar uma pessoa melhor. Por vocês eu faço o impossível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus e Nossa Senhora Aparecida, por sempre guiar e iluminar meus caminhos e escolhas, sendo um acalento para minha alma.

À Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa da Reitora Profa. Dra. Sandra Regina Goulart, à Faculdade de Odontologia da UFMG, na pessoa do Diretor Prof. Dr. João Batista Novaes Junior, à Pós-Graduação da FAO-UFMG, na pessoa do Coordenador Prof. Dr. Mauro Henrique Nogueira Guimarães de Abreu, por proporcionarem um curso de excelência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro à pesquisa.

À Professora Doutora Maria Esperanza Cortes Segura, minha querida orientadora, por todo o suporte intelectual e emocional ao longo dessa caminhada. Por ter tido a sensibilidade de cobrar e ser um ombro amigo nos momentos específicos. Agradeço pela dedicação e desprendimento em ensinar toda a teoria e prática de um mundo completamente novo que desbravei no mestrado. Desde o primeiro dia em que pisei na FAO-UFMG a senhora se mostrou extremamente humana e uma referência que quero seguir em minha vida de pesquisador.

Ao Professor Doutor Leandro Napier de Souza, meu coorientador, por todo conhecimento transmitido e auxílio em nosso estudo.

Ao Professor Ruben Dario Sinisterra por ter aberto as portas do Departamento de Química para que eu pudesse realizar a pesquisa com o que temos de melhor na instituição.

Ao aluno de doutorado Richard Alfonso Fills Cerchar, por ser pessoa indispensável no meu aprendizado nos laboratórios 3103 da FAO, e no Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais (LEMB- Departamento de Química). Se não fosse o seu apoio e paciência, afirmo que o meu aprendizado seria muito mais lento e complexo. Tenho o prazer de poder considerá-lo um amigo.

Aos professores responsáveis por todo meu aprendizado durante o mestrado, em especial aos professores da área da Clínica Odontológica, onde dividimos um tempo de profundo conhecimento e descoberta.

Às colegas do Mestrado em Clínicas Odontológicas Fabiana Costa, Fernanda de Castro e Paula Teles pelo companheirismo e aprendizado mútuo.

Aos colegas de todas as áreas de Mestrado e Doutorado da FAO-UFMG que fizeram parte da minha jornada de pesquisa.

Aos professores Paulo Eduardo e Rodrigo Villamarim por terem sido os responsáveis, no meu tempo de graduação, pela curiosidade e descoberta do mundo da pesquisa científica. Considero vocês os meus pais da vida científica, mesmo que porventura não saibam disso.

À Maria Luísa e Maria Sofia, minhas amadas filhas, por serem a razão do meu viver. Tudo o que sou e serei é para que vocês tenham orgulho e amor pelo pai que tanto vos amam. Amo vocês infinitamente.

À Priscilla, minha amada esposa, por toda a paciência nos momentos difíceis desse percurso. Por entender e apoiar minhas ausências e acreditar em mim até quando eu mesmo não acreditava. Se hoje escrevo esta nota de agradecimento, é graças a você que sempre me incentivou para que entrasse para o mestrado e me tornasse alguém melhor. Você é a maior e melhor referência de pessoa que eu poderia ter. O meu amor por você ultrapassa todos os limites do visível e invisível. Te amo incondicionalmente, por todo o sempre.

Ao Dé e Denise, meus amados pais, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, apoiando e suportando todas as situações de alegrias e dificuldades. O sentimento de amor por vocês é o mais puro e gratuito que poderia existir. Vocês são meu exemplo de vida, de família e de perseverança. Tudo o que conquistei é devido à luta de vocês para que eu me formasse. As palavras são inexistentes quando penso em uma forma de agradecê-los por tanto. Amo vocês indubitavelmente.

Aos meus irmãos, Felipe e Leonardo, companheiros de profissão a quem divido todos os meus momentos de vida. Espero ser sempre um apoio para o que precisarem na vida de vocês.

À Jô, minha amada sogra, e Paulo Henrique, meu amado cunhado, por não serem apenas sogra e cunhado. Mas por saber que a reciprocidade do amor existente entre nós ultrapassa o parentesco social, e alcança o amor mais genuíno e profundo que as pessoas podem sentir. Obrigado por toda dedicação para com nossa família.

Agradeço, também, a todos os familiares e amigos que estiveram ao meu lado torcendo para que esse período fosse concluído com sucesso.

“Posso até sonhar, mas se eu aqui só esperar

Eu sou um deles, sou só um deles.

Minha oração só é real transformação se começar em mim.”

RESUMO

A apatita biológica apresenta em sua composição íons de carbonato, que apresentam importante papel mecânico e biológico, como a possibilidade de se ajustar e formar grânulos de formatos e tamanhos variados, permitindo a neoformação óssea através do material. Por isso, a grande disponibilidade, baixo custo, e facilidade de manuseio, fazem com que os cimentos ósseos a base de hidroxiapatita carbonatada ganhem notoriedade nas aplicações cirúrgicas de reconstrução e regeneração óssea. O objetivo do trabalho é sintetizar e caracterizar hidroxiapatita nanoparticulada (HAP) pura, substituída por carbonato (HAC) e cimento de hidroxiapatita carbonatada (CHAC). Caracterização físico-química dos pós/cimentos e testes biológicos *in vitro* foram avaliados em Cocultura celular de L929 e MC3T3. Para a pesquisa, três amostras foram estudadas: Cimento de hidroxiapatita pura (CHAP), CHAC com 5% de carbonato (CHAC5) e com 10% (CHAC10). A caracterização foi avaliada por Microscopia eletrônica de varredura (SEM), difração de raios-x (XRD), FT-IR, Ângulo de Contato, Teste de pH, Tempo de Presa e Teste de Resistência à Lavagem. Os testes biológicos foram feitos por MTT Assay, Mineralização por Vermelho de Alizarina S e Teste de Hemólise. As amostras de CHAC apresentaram resultados de caracterização semelhantes aos encontrados na literatura com picos de cristalinidade menores, evidenciando maior solubilidade da amostra, porém sem apresentar desintegração do cimento quando em solução. Além disso, se mostrou hidrofílico e apresentou pH compatível com utilização para regeneração óssea. Nos testes biológicos, CHAC apresentou aumento da viabilidade celular e estimulou mineralização, sem gerar lise celular. Portanto, foi possível observar que os cimentos a base de hidroxiapatita carbonatada apresentaram resultados promissores para a regeneração óssea, aumentando a viabilidade celular e estimulando mineralização sem causar hemólise. Os resultados dos testes de pH e tempo de presa também corroboram para a continuação dos estudos acerca do biomaterial desenvolvido.

Palavras-chave: regeneração óssea; materiais biocompatíveis; cimentos ósseos.

ABSTRACT

Evaluation of carbonated hydroxyapatite cement: development, characterization and cytotoxicity

Biological apatite has carbonate ions in its composition, which play an important mechanical and biological role, such as the possibility of adjusting and forming granules of varying shapes and sizes, allowing bone to be reformed through the material. For this reason, its wide availability, low cost and ease of handling mean that carbonate hydroxyapatite-based bone cements are gaining prominence in surgical applications for bone reconstruction and regeneration. The aim of this study is to create carbonate-substituted nanoparticulate hydroxyapatite (HAC) and produce a carbonated hydroxyapatite bone cement (CHAC). In order to achieve this objective, the initial substances and cements were synthesized and subjected to physicochemical analysis. Subsequently, they were tested in a laboratory setting using a cell coculture of L929 and MC3T3. The study examined three samples: pure hydroxyapatite cement (CHAP), CHAC with 5% carbonate (CHAC5), CHAC with 10% carbonate (CHAC10). The characterization was assessed using scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), contact angle measurements, pH testing, setting time analysis, and wash resistance testing. The cytotoxicity was assessed using the MTT test, mineralization, and hemolysis. The characterization of the CHAC yielded results consistent with those reported in the literature, indicating decreased crystallinity peaks and increased solubility of the sample. However, the cement did not disintegrate when dissolved. Furthermore, it was demonstrated to possess hydrophilic properties and exhibited a pH that is suitable for its application in bone regeneration. During the biological experiments, CHAC exhibited enhanced cell viability and promoted mineralization, without inducing cell hemolysis. Carbonated hydroxyapatite-based cements shown encouraging outcomes in promoting bone regeneration and enhancing cell viability. The test findings indicate that the developed biomaterial created a conducive environment for bone regeneration.

Keywords: bone regeneration; biocompatible materials; bone cements.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação das células ósseas.....	18
Figura 2- Representação estrutural da hidroxiapatita.....	21
Figura 3- Vistas superiores das estruturas de hidroxiapatita carbonatada mais estáveis. O carbonato pode substituir um par de íons hidroxila ou um íon fosfato....	24
Figura 4- Imagens micrográficas de SEM dos pós e cimentos de HA.. (A,B) HAP. (C,D) HAC10. (E,F) CHAP. (G,H) CHAC10.	34
Figura 5- Difractogramas dos pós e cimentos de HÁ (XRD). (A) Pós de HAP, HAC5 e HAC10. (B) Cimentos ósseos de CHAP, CHAC5 e CHAC10.....	35
Figura 6- (A) Espectro de FTIR dos pós de HAP, HAC5 e HAC10. (B) Espectro de FTIR dos cimentos ósseos CHAP, CHAC5 e CHAC10.	36
Figura 7- Imagens dos ângulos de contato de (A) CHAP; (B) CHAC5; e (C) CHAC10	
Figura 8- (A) Medidas de pH dos cimentos CHAP, CHAC5 and CHAC10 após 120 min. (B) Medidas de pH após 5 dias.....	37
Figura 9- Resistência à lavagem dos grupos CHAP, CHAC5 e CHAC10.....	39
Figura 10- MTT de contato direto em Cocultura celular de L929 e MC3T3 dos cimentos CHAP, CHAC5, CHAC10 e Grupo Controle por (A) 7 dias e (B) 14 dias.....	40
Figura 11- MTT de contato indireto de HAP, HAC5 e HAC10 em (A) células L929; (B) Células MC3T3; e (C) Cocultura celular.....	41

Figura 12- Vermelho de Alizarina S para Mineralização. (A) CHAP – 7 dias. (B) CHAC5 – 7 dias. (C) CHAC10 – 7 dias. (D) Grupo Controle – 7 dias. (E) CHAP – 14 dias. (F) CHAC5 – 14 dias. (G) CHAC10 – 14 dias. (H) Grupo Controle – 14 dias..... 42

Figura 13- Teste de Hemólise do controle positivo, controle negativo e cimentos ósseos CHAP, CHAC5 e CHAC10..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Medidas dos ângulos de contato após 1s e 30s	36
Tabela 2- Tempo de presa inicial e final dos cimentos.....	37
Tabela 3- Teste de resistência à lavagem dos cimentos ósseos.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
4 OBJETIVO	27
4.1 Objetivo Geral	27
4.2 Objetivos Específicos.....	27
5 METODOLOGIA	28
5.1 Considerações Éticas	28
5.2 Síntese da Hidroxiapatita.....	28
5.3 Caracterização físico-química das partículas de hidroxiapatita.....	29
5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	29
5.3.2 Difração de Raios-x	29
5.3.3 FT-IR (Infravermelho com Transformada de Fourier).....	29
5.4 Propriedades dos Cimentos ósseos	30
5.4.1 Composição	30
5.4.2 Caracterização físico-química dos cimentos ósseos	30
5.4.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	30
5.4.4 Ângulo de contato (molhabilidade)	31
5.4.5 Teste de Presa.....	31
5.4.6 Teste de pH	31
5.4.7 Teste de Resistência à Lavagem.....	31
5.5 Testes biológicos <i>in vitro</i>	32
5.5.1 Citotoxicidade direta	32
5.5.2 Citotoxicidade indireta.....	32
5.5.3 Teste de Mineralização (Vermelho de Alizarina)	32
5.5.4 Teste de Hemólise	33
5.6 Análise estatística	33

6 RESULTADOS	34
6.1 Caracterização dos Pós e Cimentos.....	34
6.2 Teste de ângulo de Contato (Molhabilidade).....	40
6.3 Teste de Tempo de Presa	41
6.4 Teste de pH	42
6.5 Teste de Resistência à Lavagem.....	43
6.6 Testes Biológicos <i>In Vitro</i>	44
6.6.1 Ensaio de MTT.....	44
6.6.2 Teste de Mineralização (Alizarin Red S/ Vermelho de Alizarina)	46
6.6.3 Teste de Hemólise	47
7 DISCUSSÃO.....	49
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo	62
ANEXO B – Artigo Submetido	63
ANEXO C – Artigo publicado durante o Mestrado.....	82
ANEXO D – Capítulo de livro publicado	83

1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais fazem parte de uma tecnologia que vem se mostrando eficaz no auxílio da regeneração óssea. Eles têm como objetivo apoiar a regeneração tecidual óssea, favorecendo uma auto degradação para que seja possível sua substituição por um novo osso formado (BHARADWAZ; JAYASURIYA, 2020). Nos últimos anos, vários biomateriais foram abordados na tentativa de modular a atividade celular, dentre elas, as responsáveis pela regeneração do tecido ósseo (LEE *et al.*, 2019). Deste modo, recentemente alguns cimentos ósseos contendo materiais sintéticos com composição mineral semelhante ao do osso, e que apresentam boa osteocondução tem sido amplamente utilizados para preencher defeitos ósseos (QU *et al.*, 2021).

O fosfato de cálcio apresenta uma composição específica que é a hidroxiapatita (HA). Esse arranjo persevera com uma alta quantidade de estudos para aplicações quando o assunto é regeneração óssea. Isso se deve ao fato de apresentar uma excelente estabilidade sob condições fisiológicas, manifestando alto grau de similaridade com o mineral do osso natural. No entanto, essa característica faz com que a hidroxiapatita biológica apresente baixa solubilidade química, e conseqüentemente uma menor absorção *in vitro* (SALAM; GIBSON, 2022). HA é utilizada como material de regeneração óssea desde a década de 80 (WEINER, 2006). Apresenta boa biocompatibilidade, bioatividade e propriedades de osteocondução. Em contrapartida, depara com uma fraqueza nas propriedades mecânicas. Stress ao longo do eixo Z dos cristais de HA acabam gerando fragilidades (HOU *et al.*, 2022). Para aumentar a performance da hidroxiapatita, íons funcionais de estrôncio, magnésio, zinco, carbonato, dentre outros, vem sendo incorporados à sua estrutura, para aprimorar a regeneração óssea (SALAM; GIBSON, 2022).

Nesse momento que entra a importância de se utilizar a hidroxiapatita com a adição de carbonato. A apatita biológica apresenta íons carbonato em sua composição natural, e observa-se que esses íons desempenham um importante papel mecânico e biológico (BIGI *et al.*, 1997). A Hidroxiapatita Carbonatada (HAC) possui capacidade de se ajustar e formar grânulos de geometrias e tamanhos variados e bem definidos, que se adequa aos formatos necessários dos defeitos ósseos. No entanto, há relatos de que o uso da HAC apresenta alta taxa de complicações (>32%), e isso deve-se ao fato de as HAC convencionais apresentarem baixa porosidade, impedindo

que haja mais quantidades de novos sítios de formação óssea, dificultando a remodelação (TANG *et al.*, 2009). Por isso a importância de se obter uma HAC de tamanho nanométrico, para que seja possível essa neoformação óssea por entre os grânulos. Quando comparado com a hidroxiapatita, a HAC possui melhor biosorção propiciando uma melhor remodelação óssea, além de reduzir a secreção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos (IGETA *et al.*, 2017). Contudo, ainda não se sabe se a adição de HAC aprimora a performance imunoregulatória dos andaimes sem comprometer outras funções (JIA *et al.*, 2022). Aliado a isso, a habilidade de delinear as propriedades físico-químicas das partículas de carbonato de cálcio tem ganhado notoriedade devido à possibilidade de favorecer a distribuição medicamentosa no organismo, a partir do momento em que a geometria das partículas afeta, substancialmente, o comportamento celular (BAHROM *et al.*, 2019).

Dessa forma, pela grande disponibilidade, baixo custo, e facilidade de manuseio, os cimentos ósseos a base de HA vem ganhando notoriedade nas aplicações cirúrgicas de reconstrução e regeneração óssea (MANTSOPOULOS *et al.*, 2021). E a adição dos carbonatos nos cimentos, dentre todos os materiais inorgânicos presentes, também são favorecidos nas aplicações biomédicas de forma geral, não somente pelas vantagens acima mencionadas envolvendo os cimentos à base de HA, mas também por sua biocompatibilidade, segurança, ser pH-sensível e sua biodegradação (BAHROM *et al.*, 2019).

Portanto, esse trabalho tem como objetivo sintetizar hidroxiapatita nanoparticulada substituída por carbonato, por precipitação aquosa e em baixa temperatura. Caracterização físico-química e citotoxicidade também serão avaliadas. Posteriormente, esse trabalho terá como finalidade o desenvolvimento de um cimento de hidroxiapatita carbonatada, que será avaliado físico-quimicamente e testado *in vitro*, tendo grande importância para potencial utilização para regeneração óssea.

2 JUSTIFICATIVA

A regeneração óssea apresenta-se como um grande entrave para as reabilitações. As fraturas e perdas ósseas, e até mesmo as reabsorções fisiológicas trazem uma grande dificuldade quando se busca um planejamento reabilitador ancorado no tecido ósseo. Isso se deve ao fato de em certas situações o próprio organismo não possuir a capacidade de gerar um reparo completo do sítio afetado.

Dessa forma, muito se estuda sobre biomateriais que apresentam essa capacidade de favorecer uma recuperação de maior qualidade, permitindo uma neoformação óssea mais madura, resistente. Esses biomateriais ganham sua devida importância quando retiram a necessidade de enxertos autógenos, que são notadamente procedimentos que demandam intervenções cirúrgicas (em alguns momentos mais amplas) que geram extensas morbidades trans e pós-operatórias, além do alto custo inerente à essa opção reabilitadora.

Portanto, os cimentos ósseos à base de hidroxiapatita carbonatada nanoparticulada se tornam uma alternativa terapêutica para auxiliar na regeneração óssea. É uma opção de baixo custo e grande disponibilidade, que se comprovada melhor eficácia frente às outras opções existentes, tem o potencial de gerar uma mudança nos protocolos regeneradores.

3 REVISÃO DE LITERATURA

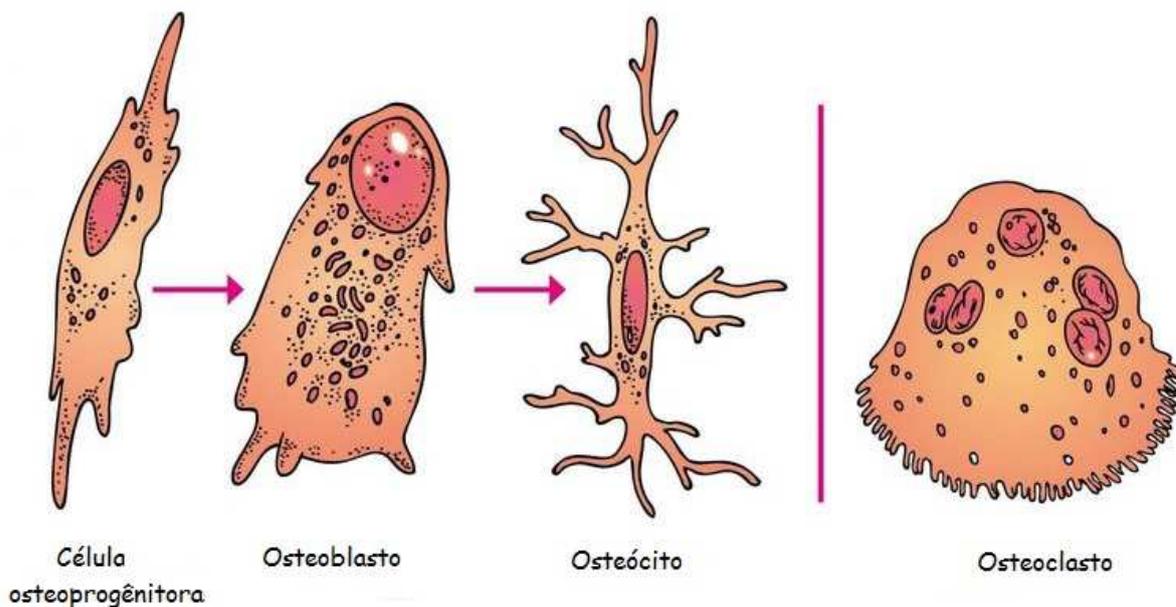
O osso é caracterizado por ser um tecido conjuntivo mineralizado, fornecendo estrutura e suporte ao peso corpóreo, proteção de órgãos vitais, apoio de movimentos e hospedagem de células hematopoiéticas. É formado por células e material extracelular calcificado (matriz óssea), que é constituída por 50% de parte orgânica e 50% de material mineral. A mineralização da matriz proporciona dureza ao tecido, sendo que a matriz colágena é responsável por permitir certa flexibilidade. A parte orgânica do tecido ósseo é composta por 95% de colágeno tipo I, além de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas. A parte inorgânica é composta por íons, tendo em sua grande maioria fosfato de cálcio, responsável pela formação dos cristais de hidroxiapatita (JUNQUEIRA, 2013).

Na matriz óssea extracelular, o colágeno tipo I é secretado pelos osteoblastos, conferindo resistência à tração do osso. As proteínas ósseas não colágenas incluem osteonectina, osteopontina e osteocalcina e sialoproteína II, além de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), fibronectina e fatores de crescimento, que são responsáveis por conferir força e elasticidade ao longo da matriz (BEU *et al.*, 2017). O maior constituinte da matriz extracelular óssea são os cristais de apatita, apresentando-se em 60% do peso, promovendo resistência compressiva (KOMORI, 2020).

Em nível celular, o tecido ósseo é composto por vários tipos de células. As primeiras células são as osteoprogenitoras, caracterizadas por serem de origem mesenquimal, tendo o potencial de se diferenciarem em osteoblastos. Essas células perduram até a vida pós-natal e podem ser encontradas em quase todas as superfícies livres dos ossos (endóstio, perióstio e trabéculas de cartilagem calcificada). Durante a fase de crescimento e em necessidade de reparação óssea, as células osteoprogenitoras aumentam sua atividade, diferenciando-se em novos osteoblastos para o tecido ósseo. Os osteoblastos são células jovens e são responsáveis pela formação da parte orgânica da matriz óssea. Eles participam da mineralização da matriz, tem o formato cúbico ou cilíndrico e se localizam na superfície do perióstio. Os osteócitos ficam localizados em lacunas dentro da matriz óssea, e tem como função a manutenção da integridade da matriz óssea. As lacunas formam canálculos que são preenchidos por prolongamentos dos osteócitos, que se comunicam entre si, podendo passar moléculas de íons entre as células. Outro tipo

celular presente no tecido ósseo são os osteoclastos, células de tamanho maior resultante da fusão de várias outras células do sistema fagocitário mononuclear. Se originam da medula óssea, e objetivam a reabsorção e remodelação óssea (JUNQUEIRA, 2013).

Figura 1- Representação das células ósseas



Fonte: JUNQUEIRA, 2013

Anatomicamente, os ossos podem ser classificados como compacto ou esponjoso. O osso compacto, ou cortical, fica localizado superficialmente e apresenta menos de 10% de porosidade. O osso esponjoso, ou trabecular se encontra mais internamente e apresenta até 90% de porosidade, onde acontecem inúmeros processos biológicos mediados por interação celular óssea, como remodelação dinâmica, maturação, diferenciação e reabsorção (BOSE *et al.*, 2013).

O processo fisiológico de remodelação óssea é mantido por um método dinâmico que inclui fases de osteogênese e reabsorção. Esse processo é fundamental para a adaptação do esqueleto ao uso, bem como para a homeostase do cálcio e regeneração de fraturas. A osteogênese ocorre pela síntese da matriz óssea pelos osteoblastos em duas fases: deposição de matriz orgânica e mineralização. Na primeira fase as células osteoblásticas secretam proteínas colágenas, não colágenas e proteoglicanos, formando a matriz orgânica. A segunda fase ocorre em duas etapas distintas. A primeira etapa é a vesicular, onde ocorre liberação de vesículas pelos

osteoblastos, que serão incorporadas de íons cálcio e fosfato. Na segunda etapa, fibrilar, ocorre uma supersaturação dos íons, que leva à ruptura da vesícula e liberação dos cristais de hidroxiapatita (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). O segundo processo fisiológico, denominado de fase de reabsorção, ocorre pela secreção de ácidos que são responsáveis por diminuir o pH gerando uma dissolução de minerais e de enzimas hidrolíticas, que atuam na dissolução da matriz celular (BUSCH *et al.*, 2021).

Nos casos em que se há uma perda da integridade do osso, vários processos entram em ação na tentativa de restabelecer o tecido lesionado. Porém, um agravante ocorre em casos em que não se dá somente a perda da integridade esquelética, mas também das estruturas vasculares que nutrem o local da fratura. O suprimento sanguíneo é determinante para a cicatrização, e é importantíssimo para as fases da regeneração óssea, que compreende uma etapa inflamatória, a formação de calos moles, calos duros e a fase de remodelação (WALMSLEY *et al.*, 2016).

Com isso, para auxiliar e promover reparo ósseo nessas condições, os enxertos ósseos foram desenvolvidos e devem cumprir certos requisitos, como um ambiente nutritivo com alto grau de suprimento sanguíneo, presença de uma loja cirúrgica tridimensional, disponibilidade de células osteoprogenitoras, e presença de fatores de crescimento (BATTAFARANO *et al.*, 2021).

Cirurgiões-dentistas encaram diariamente a dificuldade de tratamento de pacientes devido à perda óssea causada por perda dentária, periodontite severa e cirurgias de ressecção tumorais. O defeito ósseo gerado por essas condições não somente dificulta a reabilitação protética, como também pode gerar um efeito estético deletério, como nos casos das doenças periodontais (HANDRINI DEWI; DEWI ANA, 2018). Com isso, faz-se necessário lançar mão de cirurgias ósseas de enxerto para reabilitar o osso perdido e restaurar o contorno da crista óssea. Para esse fim, vários materiais de enxerto ósseo podem ser utilizados nos procedimentos cirúrgicos (SHAKIBAIE-M, 2013).

O desenvolvimento de biomateriais propiciou a evolução da engenharia de tecidos, que se refere a prática de combinar andaimes, células e moléculas biologicamente ativas em tecidos funcionais. Seu objetivo é reunir arcabouços funcionais que restaure, mantenha ou melhore tecidos danificados, ou até mesmo órgãos, em sua totalidade.

O crescente pleito por materiais que atuam como substitutos ósseos tem estimulado o entendimento da cicatrização óssea, biologia molecular e aprimoramento

tecnológico de materiais com predicados ideais para regeneração óssea e engenharia de tecidos (KIM *et al.*, 2013). A engenharia de tecidos ósseos se tornou uma opção promissora de tratamento alternativo para regeneração do osso alveolar. Uma enorme variedade de biomateriais, como a hidroxiapatita, β -tricálciofosfato, fosfato de cálcio, é indicada para povoar células tronco e progenitoras para induzir osteogênese e consequentemente desenvolver constructos equivalentes aos tecidos (FARRÉ-GUASCH *et al.*, 2013).

Quatro categorias básicas de enxerto são utilizadas para regeneração óssea: enxerto autógeno, alógeno, xenógeno e aloplásticos. Os enxertos autógenos são considerados padrão-ouro por fornecer um bom alicerce para osteocondução, e por conter fatores de crescimento para osteoindução bem como a presença de células progenitoras que favorecem a osteogênese. Em contrapartida, a morbidade gerada pelo procedimento cirúrgico e a limitação de fonte de enxerto se tornam uma limitação para essa categoria. Os enxertos alógenos e xenógenos apresentam resistência quanto a utilização devido a possibilidade de provocar transmissão de doenças e até gerar uma reação imunológica tardia. Então, devido a essas intempéries, tem havido uma crescente onda de interesse no desenvolvimento de enxertos sintéticos voltados para a regeneração óssea (MOLLY *et al.*, 2008).

Esses materiais sintéticos desenvolvidos para enxertia óssea necessitam apresentar propriedades específicas para que o sucesso seja alcançado no procedimento cirúrgico, como osteocondução, osteopromoção e osteoindução. Materiais osteocondutivos funcionam como andaimes permitindo que as células precursoras de osteoblastos cresçam em sua superfície interna e externa levando a neoformação óssea. A osteopromoção é o estímulo físico para aumentar a formação do osso no processo de regeneração óssea. E materiais osteoindutivos são capazes de estimular a formação óssea, mesmo em ambientes não ósseos, pelo recrutamento de células progenitoras indiferenciadas e pluripotentes (BUSCH *et al.*, 2021).

O sucesso do procedimento de enxertia necessita de uma reabilitação óssea em quantidade (comprimento e espessura) e qualidade aceitável. Para isso, são utilizadas técnicas de enxerto onlay, inlay, expansão óssea e regeneração óssea guiada, dentre outros procedimentos de reconstrução (REININGER *et al.*, 2016).

Em todo o mundo, milhões de pacientes sofrem de algum problema ósseo relacionado a inúmeras causas, necessitando de enxerto ósseo (ARCHUNAN; PETRONIS, 2021). Estima-se que 2,2 milhões de procedimentos de enxertia sejam

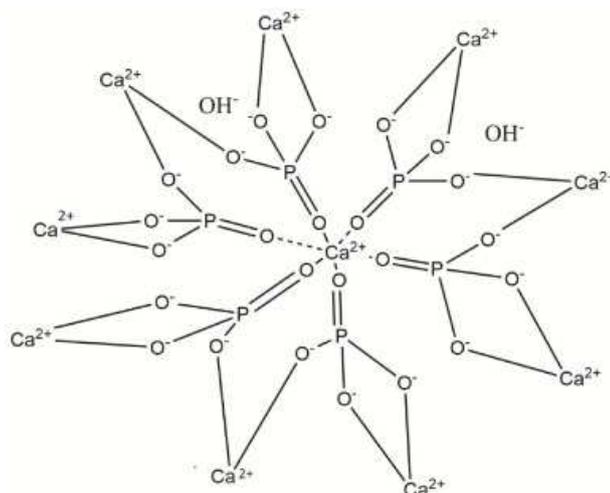
realizados anualmente, com uma taxa de incidência projetada de 13% ao ano (HJØRTING-HANSEN, 2002).

Os ortofosfatos de cálcio são sais de ácido fosfórico tribásico e apresentam íons que se manifestam na fase mineral de ossos e dentes, além de calcificações provenientes de patologias (ELLIOTT, 1994). Os ortofosfatos de cálcio do grupo apatita apresentam grande disponibilidade na natureza e se consolidam como os principais componentes inorgânicos dos tecidos duros (EVIS; WEBSTER, 2011).

Dessa forma, a utilização de fosfatos de cálcio tem sido amplamente pesquisada por áreas da saúde, principalmente pelo fato de assemelhar com a matriz inorgânica do osso e ser biocompatível. Além disso, devido a possibilidade de desenvolvimento e produção do biomaterial em laboratório, vêm sendo utilizados para enxertia óssea, evitando-se, por conseguinte a necessidade de cirurgias para obtenção de materiais de auto enxertia. Esses biomateriais apresentam a capacidade de serem substituídos por tecido ósseo, pelo fato de possuir osteocondutividade e facilitar a migração, fixação e proliferação de células ósseas (BOSE *et al.*, 2013). Entretanto, não são osteoindutores, sendo incapazes de induzir a osteogênese, e apresenta baixa resistência à compressão (GUTIERRES *et al.*, 2006).

A Hidroxiapatita é um mineral comumente encontrado em estruturas ósseas de vertebrados, e pertence às cerâmicas de Fosfato de Cálcio. É uma substância bioativa e osteocondutora que é capaz de realizar uma forte ligação química com o tecido ósseo do hospedeiro, sendo amplamente utilizada como material de enxertos ósseos. Não apresenta toxicidade e nem imogenicidade. A HA estequiométrica se apresenta sob a fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tendo proporção atômica de 1,67.

Figura 2 – Representação estrutural da hidroxiapatita



Fonte: PANDA; BISWAS; PAUL, 2021

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio que apresenta reabsorção e remodelação óssea extremamente lentas, fazendo com que permaneça no organismo do hospedeiro por muito tempo (LOPES, 1999). Apresenta, estruturalmente, possibilidade de invasão vascular. Mas devido à lentidão de reabsorção e integração, bem como da manutenção dos grânulos na posição correta, novos materiais (pastas, cimentos) vem sendo desenvolvidos com características intrínsecas superiores (GUTIERRES *et al.*, 2006). A hidroxiapatita natural é bem semelhante àquela sintetizada em laboratório, levando-se em conta sua composição química e comportamento *in vivo*, sendo amplamente utilizado não só na área biomédica, mas também para revestimentos de prótese dentárias e ortopédicas (LOPES, 1999).

A hidroxiapatita sintética apresenta semelhança com o mineral do osso natural, porém há discrepâncias quando comparada com a Hidroxiapatita biológica. A apatita biológica apresenta baixa cristalinidade e é estruturalmente nanométrica, fazendo com que seja altamente solúvel quando comparada com a estequiométrica (RATNAYAKE; MUCALO; DIAS, 2017). No entanto, devido à similaridade com o osso, a hidroxiapatita tem sido largamente utilizada como biomaterial para enxertia óssea, além das vantagens já relatadas, mas também por formar ligações químicas diretas com os tecidos ósseos e vivos. Contudo, a hidroxiapatita biológica é mais resistente do que a sintética, inviabilizando seu uso em estado puro (CELOTTI *et al.*, 2006; EVIS; WEBSTER, 2011a; GUTIERRES *et al.*, 2006).

Com isso, nos últimos anos o desenvolvimento de hidroxiapatitas sintéticas com melhorias em suas propriedades mecânicas e biológicas vêm sendo o foco das

pesquisas da área. A síntese de hidroxiapatita de tamanho nanométrico vem apresentando superioridade qualitativa, quando comparada com a síntese em microescala. A atividade superficial e apresentarem estruturas ultrafinas propiciam melhor relação com o tecido após a implantação (D'ELÍA *et al.*, 2013; SIRAIT *et al.*, 2022). Estudos já demonstraram que a HA nanométrica acarreta maior adesão, diferenciação, proliferação, osteointegração e deposição de minerais contendo cálcio na superfície, quando comparada com HA de tamanho micrométrico. Dessa forma, a formação de novo tecido ósseo ocorre com melhor qualidade em menor tempo (EVIS; WEBSTER, 2011b; WEBSTER *et al.*, 2000). Porém, a reabsorção fisiológica ainda se apresenta como uma limitação, levando a uma presença residual de HA após longos períodos (SAMAVEDI; WHITTINGTON; GOLDSTEIN, 2013).

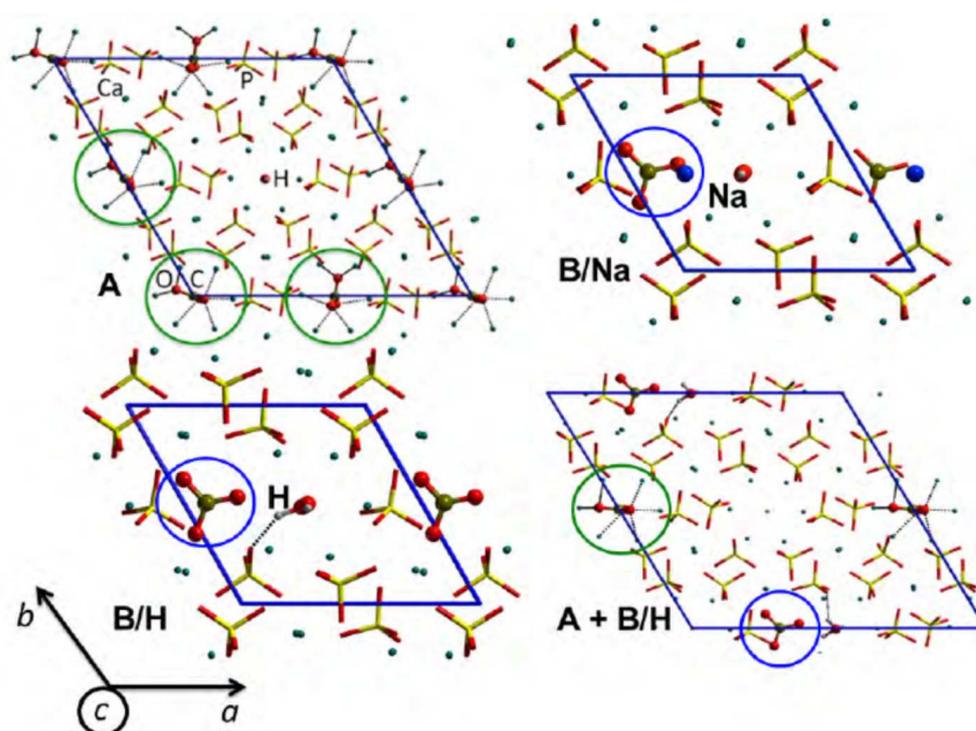
Para melhorar ainda mais a performance do biomaterial, alguns aditivos são dopados na rede de HA, conferindo aumento das propriedades mecânicas e químicas do material. A incorporação de íons entra em questão, a partir do momento em que a utilização da HA se mostra eficaz no auxílio da regeneração óssea (COPETE; LÓPEZ; BAUDIN, 2024a). A utilização de íons de Mg e Si tem sido amplamente difundido pelos benefícios já estudados (BAUDÍN; PENA, 2023; DIAS *et al.*, 2023).

Portanto, pela grande presença de íons carbonato em esmalte, dentina e tecido ósseo, a incorporação desse aditivo na cadeia de HA se torna uma abordagem promissora, a partir do momento em que propicia um aumento da reabsorção bioativa e osteocondutividade pela proximidade com as concentrações encontradas no osso natural (MOHD PU'AD *et al.*, 2019).

Dessa forma, estudos já vem demonstrando que a dopagem da HA com carbonato confere melhora nas propriedades mecânicas, além de propiciar um aumento nas taxas de reabsorção *in vitro* em ambientes fisiológicos e ácidos. Adicionalmente, maiores dopagens de carbonato vêm conferindo melhor adequação do material quando considerado para reparação óssea (COPETE; LÓPEZ; BAUDIN, 2024). De modo geral, a substituição de carbonato na rede estrutural da hidroxiapatia durante o processo de síntese, vai determinar o tipo de hidroxiapatita carbonatada. Quando o íon carbonato substitui o íon hidroxila, será formada a hidroxiapatita carbonatada tipo-A. A substituição do carbonato no lugar de íons fosfato, é formada a hidroxiapatita tipo B. Na área biomédica, a utilização de hidroxiapatita tipo-B é mais utilizada pelo fato de, nas apatitas biológicas, podem causar uma diminuição da

crystalinidade e aumento da solubilidade, favorecendo a regeneração óssea (PERMATASARI; YUSUF, 2019).

Figura 3 - Vistas superiores das estruturas de hidroxiapatita carbonatada mais estáveis. O carbonato pode substituir um par de íons hidroxila (círculos verdes) ou um íon fosfato (círculos azuis). Superior esquerdo, CHA tipo A com três dos quatro pares de íons OH substituídos; superior direito, CHA tipo B com Na como compensador de carga; inferior esquerdo, tipo B com H como compensador de carga; inferior direito, tipo A e B, com H como compensador de carga do tipo B



Fonte: CORNO *et al.*, 2011

Porém, mesmo com as melhorias no desenvolvimento do biomaterial, observou-se que a manutenção dos grânulos no sítio cirúrgico não ocorria como desejado, levando-se à necessidade da criação de compósitos e cimentos ósseos para melhor estabilização do material (GUTIERRES *et al.*, 2006). Dessa forma, os cimentos de fosfato de cálcio foram desenvolvidos para que fosse possível realizar a moldagem da pasta junto ao defeito ósseo, apresentando capacidade de auto endurecimento, impedindo o escape do material como acontecia no formato de grânulos (BIGI *et al.*, 1997; QU *et al.*, 2021).

Os cimentos ósseos são resultado da mistura de uma fase pó e uma fase líquida, que tomará presa após a implantação na loja cirúrgica (GINEBRA *et al.*, 2012). Eles podem ser categorizados como cimento ósseos acrílicos, cimentos de fosfato de

cálcio (CFC), cimentos de sulfato de cálcio, dentre outros (YOUSEFI, 2019). Os CFCs apresentam como produto final a brushita ou a HA.

Os cimentos de fosfato de cálcio apresentam limitações em suas propriedades físico-químico-biológicas, pois apresentam baixa resistência à compressão e à lavagem, além do fato de poderem apresentar taxas de reabsorção incompatíveis com os tempos clínicos, sendo muito rápida (brushita) ou extremamente lenta (HA).

Visando a obtenção de um cimento com melhores propriedades mecânicas e biológicas, pesquisadores desenvolveram pesquisas com a criação de cimentos de hidroxiapatita nanoparticulada, substituída ou não, ou com modificações na superfície.

Os cimentos devem ter presa lenta o suficiente para que seja possível a utilização pelo profissional no procedimento cirúrgico, além de viscosidade adequada para que não ocorra o escoamento excessivo do material (ELIAZ; METOKI, 2017). Para aprimorar ainda mais os cimentos, a incorporação de polímeros se mostrou eficaz no controle do tempo de presa, resistência à lavagem, macroporosidade, resiliência e resposta biológica (JIA *et al.*, 2022; PEREZ; KIM; GINEBRA, 2012). Os polímeros podem ser adicionados na fase líquida ou no pó, podendo ser naturais ou sintéticos (PEREZ; KIM; GINEBRA, 2012).

A incorporação de polímeros na formulação dos cimentos ósseos vêm sendo foco de muitas pesquisas por ser considerada uma estratégia eficiente e útil para sobressair as limitações presentes nas propriedades do material (LIU *et al.*, 2014). Devem ser biodegradáveis e apresentarem interação celular e química em sua superfície, para que seja possível adesão e crescimento de células sem gerar resposta inflamatória pós-implantação. Além disso deve apresentar porosidade, área de superfície e espaço adequado para matriz extracelular (SHEIKH *et al.*, 2015).

Os éteres de celulose, como metilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), são opções interessantes para incorporação devido a boa biocompatibilidade e propriedade de viscosidade. Pequenas quantidades do polímero já são suficientes para fornecer não somente injetabilidade e coesão às pastas, mas também melhoras a resistência a fratura dos materiais (BOHNER, M., 2001). Por isso, pelo fato de os cimentos de fosfato de cálcio geralmente terem um escoamento aumentado, dificultando a sua manutenção em lojas cirúrgicas mais abertas, a utilização de polímeros na formulação desses cimentos faz com que o formato e a posição da

enxertia se mantenham no local correto, propiciando maior chance de sucesso do procedimento cirúrgico(LIU *et al.*, 2014).

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi a sintetização, caracterização físico-química e avaliação de cimento de Hidroxiapatita carbonatada nanoparticulada para regeneração óssea, e seus efeitos em fibroblastos e osteoblastos.

4.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar Hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita carbonatada (CHA), pelo método de precipitação, em condições congruentes experimentais e em baixa temperatura;
 - Caracterizar as propriedades físico-químicas das HAs sintetizadas
 - Avaliar *in vitro* a citotoxicidade das CHAs sobre células fibroblásticas e osteoblásticas;
 - Caracterizar físico-quimicamente um cimento a base de Hidroxiapatita carbonatada;
 - Avaliar as propriedades de resistência à lavagem, molhabilidade, alterações de pH, e tempo de presa dos cimentos desenvolvidos;
 - Avaliar o perfil de liberação de íons dos cimentos obtidos;
 - Avaliar *in vitro* citotoxicidade indireta da hidroxiapatita carbonatada e dos cimentos a base de HAC sobre linhagens de células fibroblásticas e osteoblásticas;
 - Avaliar a proliferação de osteoblastos mantidos em contato com cimento de HAC.

5 METODOLOGIA

5.1 Considerações Éticas

Este estudo foi desenvolvido de acordo com a Resolução nº 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil. Por se tratar de um estudo laboratorial *in vitro* não é necessária a submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais. As células foram de referência do banco de células de Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

5.2 Síntese da Hidroxiapatita

A Hidroxiapatita pura foi sintetizada levando-se em conta o método descrito por Cox *et al.* em 2014, com modificações. Duas soluções foram preparadas. A primeira solução (A) era composta por 0,04 M (4,6012 g) de fosfato de amônio monobásico ((NH₄)H₂PO₄), e foi solubilizada em 150 mL de água deionizada sob agitação magnética vigorosa, até completa homogeneização. A segunda solução (B) continha 0,067 M (15,7512 g) de nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂.4H₂O), e foi solubilizada em 120 mL de água deionizada sob agitação magnética vigorosa, até completa solubilização.

Para ajustar o pH em 11, o hidróxido de amônio foi adicionado à solução A, gota a gota. Em seguida, a solução de nitrato de cálcio foi efundida em um balão de reação de três bocas, que foi previamente fixado a um condensador e mantida a um banho de glicerina sob temperatura de 100°C, e agitação magnética constante. Após, a solução de fosfato de amônio monobásico foi vertida em funil de separação, e adicionado gota a gota, de forma lenta, à solução B.

A mistura foi mantida sob banho de glicerina e agitação constante por 24h e 100°C. Ao término do tempo estipulado, o precipitado obtido foi filtrado e lavado com água deionizada até alcançar o pH 7. O produto resultante desse processo foi submetido a tratamento térmico de secagem em estufa a 100°C, por um período de 24h. Passado o tempo predisposto, a hidroxiapatita foi macerada para pulverizar as partículas adequadamente.

Para a sintetização da hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada foi empregada a mesma técnica e condições idênticas de temperatura, pH e tempo. A solução de carbonato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 0,05mol/L e 0,10mol/L foi adicionada a solução B, e posteriormente incorporada à solução A sob fluxo de 4mL/min.

Com isso, foram desenvolvidos os seguintes grupos das partículas: HAP (hidroxiapatita pura, HAC5 (hidroxiapatita carbonatada 5%), HAC10 (hidroxiapatita carbonatada 10%).

5.3 Caracterização físico-química das partículas de hidroxiapatita

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A avaliação morfológica das partículas de HAP e HAC foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) utilizando o microscópio eletrônico de varredura (JEOL modelo JSM 6360 LV), do Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, com tensão de aceleração de 15 kV magnificação de 1000x. Para as análises, as amostras foram metalizadas com 3 nm de ouro.

5.3.2 Difração de Raios-x

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

5.3.3 FT-IR (Infravermelho com Transformada de Fourier)

A FT-IR foi utilizada para realizar a identificação dos grupos funcionais presentes nas amostras de HAP, HAC5 e HAC10. Os resultados foram registrados através do aparelho espectrofotômetro Perkin Elmer GX com resolução de 4 cm^{-1} , do Departamento de Química da UFMG. As amostras, preparadas em pastilhas de

brometo de potássio (KBr), passaram pelo processo de secagem previamente e analisadas na região entre 4000 - 400 cm^{-1} . Os dados foram tratados pelo programa ACD/SpecManager 6.0, ACD/labs

5.4 Propriedades dos Cimentos ósseos

5.4.1 Composição

Os cimentos ósseos que têm a Hidroxiapatita como base são compostos por uma fase em pó e uma fase líquida. A fase em pó foi inteirada por 90% de HA e 10% de fosfato de cálcio dibásico anidro. A composição do líquido foi de solução aquosa contendo 2% de hidrogenofosfato de sódio, 2% de cloreto de cálcio dihidratado, 2% de beta-glicerofosfato, 5% de hidroxipropilcelulose (HPMC). Os grupos estudados foram: CHAP (cimento de hidroxiapatita pura), CHAC5 (cimento de hidroxiapatita carbonatada 5%), CHAC10 (cimento de hidroxiapatita carbonatada 10%)

5.4.2 Caracterização físico-química dos cimentos ósseos

A caracterização da composição e estrutura dos cimentos foi feita pela técnica de difração de raios-X, absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier, teste de molhabilidade.

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

A FT-IR foi realizada para analisar a interação molecular das amostras dos cimentos de CHAP, CHAC5 e CHAC10. Para esse fim os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados pelo espectrofotômetro Perkin Elmer GX com resolução de 4 cm^{-1} , do Departamento de Química da UFMG. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr, seco previamente e analisadas na região entre 4000 - 400 cm^{-1} . Os dados foram tratados pelo programa ACD/SpecManager 6.0, ACD/labs.

5.4.4 Ângulo de contato (molhabilidade)

A molhabilidade é caracterizada pelo ângulo de contato, que é definido como o ângulo formado entre a tangente da interface líquido-vapor e à superfície sólida na linha de contato trifásica. Por convenção, o ângulo de contato é medido do lado do líquido.

Para realização do experimento foi utilizado o Sistema de Medição de Ângulo de Contato, modelo SEO Phoenix 300 Touch contact angle, do Departamento de Química da UFMG.

5.4.5 Teste de Presa

Os tempos de presa inicial e final dos cimentos foram mensurados pela utilização de agulhas Gillmore, seguindo o Padrão ASTM C266-08 (SIEK, *et al.*, 2017). As fases pó e líquida do cimento foram manipuladas por 120s, até homogeneizar. A pasta manipulada foi inserida em discos metálicos com dimensões de 10mm x 3mm. Após 120s, a agulha leve (113,4g e 2,12mm) foi posicionada sobre a superfície da pasta por 5s, e a cada 1min. A definição do tempo de presa inicial se deu quando a agulha não deixou impressão na superfície. O tempo de presa final foi definido quando a agulha pesada (453,6g e 1,06mm) não foi capaz de demarcar a superfície do cimento. As medidas foram realizadas em triplicata.

5.4.6 Teste de pH

Para a medida do pH, as amostras foram inseridas em tubos cônicos de poliestireno (Falcon) contendo 10mL de água de MilliQ®, e mantidas sob temperatura ambiente. As mensurações foram realizadas utilizando-se o aparelho MS TECNOPON, mPA-210, Brasil. Os valores foram medidos nos intervalos de 5, 10, 20, 30, 60, 120min; e após 1, 2, 3, 4 e 5 dias. A água de MilliQ foi substituída diariamente. O teste foi realizado em triplicata.

5.4.7 Teste de Resistência à Lavagem

O teste de resistência à lavagem dos cimentos foi realizado através da avaliação de método simples de perda de peso. As amostras utilizadas neste teste foram as mesmas utilizadas no teste de presa, e foram imersas em 20mL de água de MilliQ. Após 24h, as amostras foram colocadas em estufa a 70°C por 1h, e foram novamente pesadas. Os testes foram realizados em triplicada, e o resultado final foi calculado através de perda percentual da massa total.

5.5 Testes biológicos *in vitro*

5.5.1 Citotoxicidade direta

Para realização dos testes de citotoxicidade direta dos cimentos foi feito o ensaio de MTT, a Cocultura Celular de L929 ATCC n° CCL-1 e MC3t3-E1 ATCC n° CRL-2594 foram expostas ao contato direto com as amostras contendo meio de cultura (DMEM +SFB) em concentração de 200 µg/mL, em placas de 24 poços. As amostras apresentavam 6x4x2mm e foram confeccionadas em duplicata. Após, as amostras receberam radiação ultravioleta por 1 hora para desinfecção. Os tempos definidos foram de 7 e 14 dias.

5.5.2 Citotoxicidade indireta

A citotoxicidade indireta do pó de HA foi avaliada por ensaio de MTT, através do eluato (sobrenadante) dos mesmos. Para obtenção dos eluatos foram pesadas 2g de cada grupo, que foram desinfectados com radiação ultravioleta por 1 hora. Em seguida, cada amostra foi inserida em microtubos (Eppendorf) contendo 2 mL do meio de cultura próprio para cada linhagem celular utilizada e após, incubadas a 37°C por 24h. 200 µL de eluato foram inseridos em placa de 96 poços, nos tempos de 24, 48 e 72h. Os testes foram realizados em hexaplicatas e a absorbância foi mensurada em comprimento de onda de 570 nm usando o espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan (MCC/340 spectrophotometer).

5.5.3 Teste de Mineralização (Vermelho de Alizarina)

Nódulos de Calcificação presentes nas células podem ser observados pelo teste de Vermelho de Alizarina S. Amostras do cimento de 2x2x2mm foram inseridas em placa de 24 poços. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Após 7 e 14 dias, as culturas celulares foram lavadas duas vezes em PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavados novamente com PBS por duas vezes. Após a segunda lavagem, o vermelho de Alizarina 0,2% foi inserido nos poços e deixado por 5 minutos. Após o tempo, foi realizada lavagem abundante com PBS. As placas foram levadas ao ICB/UFMG e os poços foram observados e fotografados pelo aparelho Cytation 5.

5.5.4 Teste de Hemólise

O teste de hemólise foi realizado para avaliar a compatibilidade das amostras com o sangue. Para o estudo, tubos cônicos (Falcon) foram preenchidos com 1mL de sangue de coelho e 9mL de PBS. O tubo cônico foi centrifugado a 500g por 10 min. Após o término, retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se 9mL de PBS. Repetiu-se o processo por três vezes, e após a última centrifugação, retirou-se o sobrenadante e adicionou 1mL de PBS. O plaqueamento foi realizado em placa de 96 poços contendo controle positivo (100µL sangue + 100µL TritonX), controle negativo (100µL sangue + 100µL PBS) e eluatos de CHAP, CHAC5 e CHAC10 (100µL sangue + 100µL eluato). O teste foi realizado em hexaplicata. Após o plaqueamento, a placa foi mantida em incubação por 1h a 37°C e centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos a 4°C.

5.6 Análise estatística

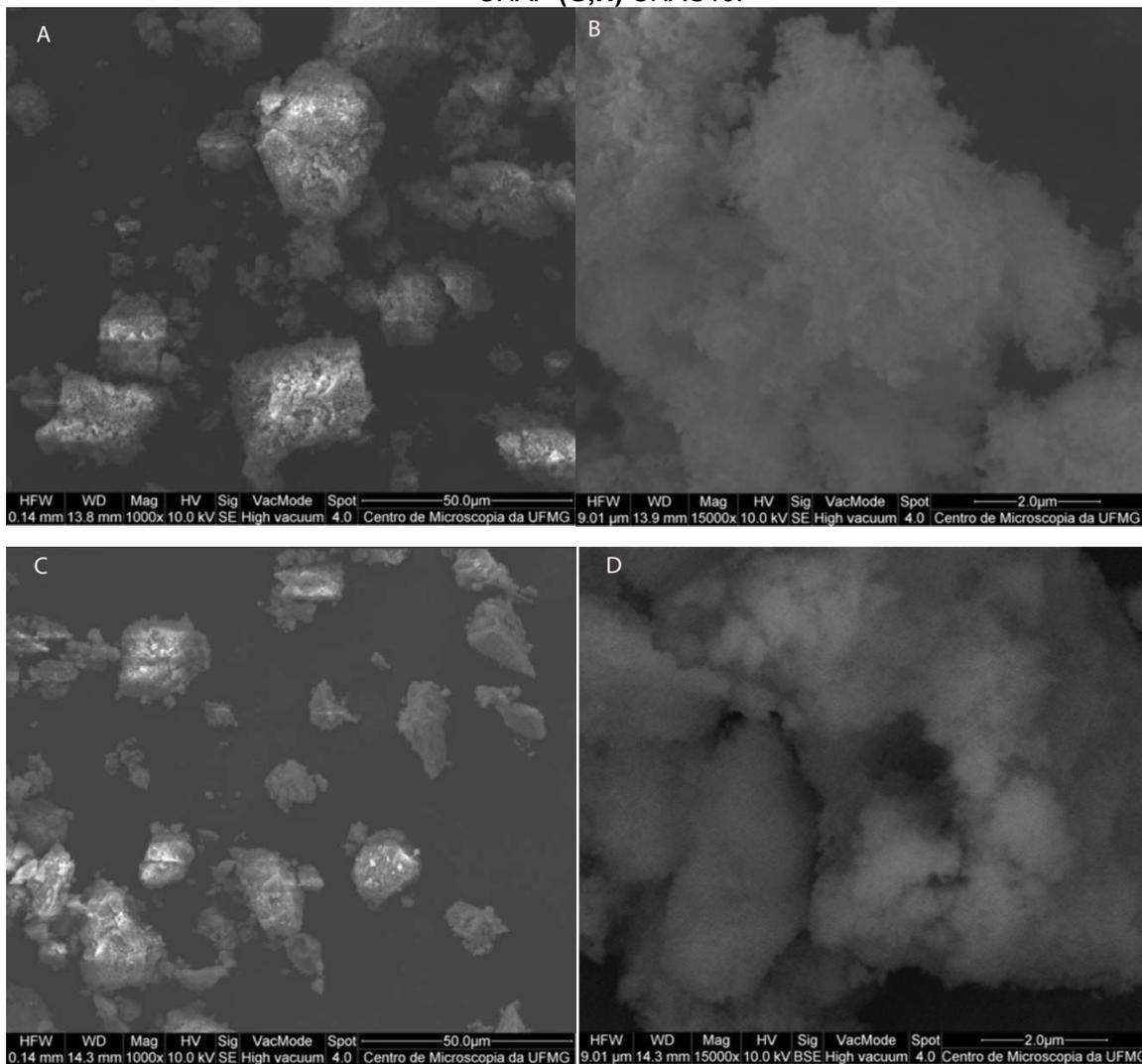
Os resultados encontrados nos testes foram representados através de média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo software OriginPro 2024b. O teste de citotoxicidade das partículas e dos cimentos de HAP e HAC foram analisados por ANOVA de um fator, e após foi realizado o teste de Tukey para avaliar os grupos comparativamente. O nível de significância do teste para os resultados encontrados foi de 5%.

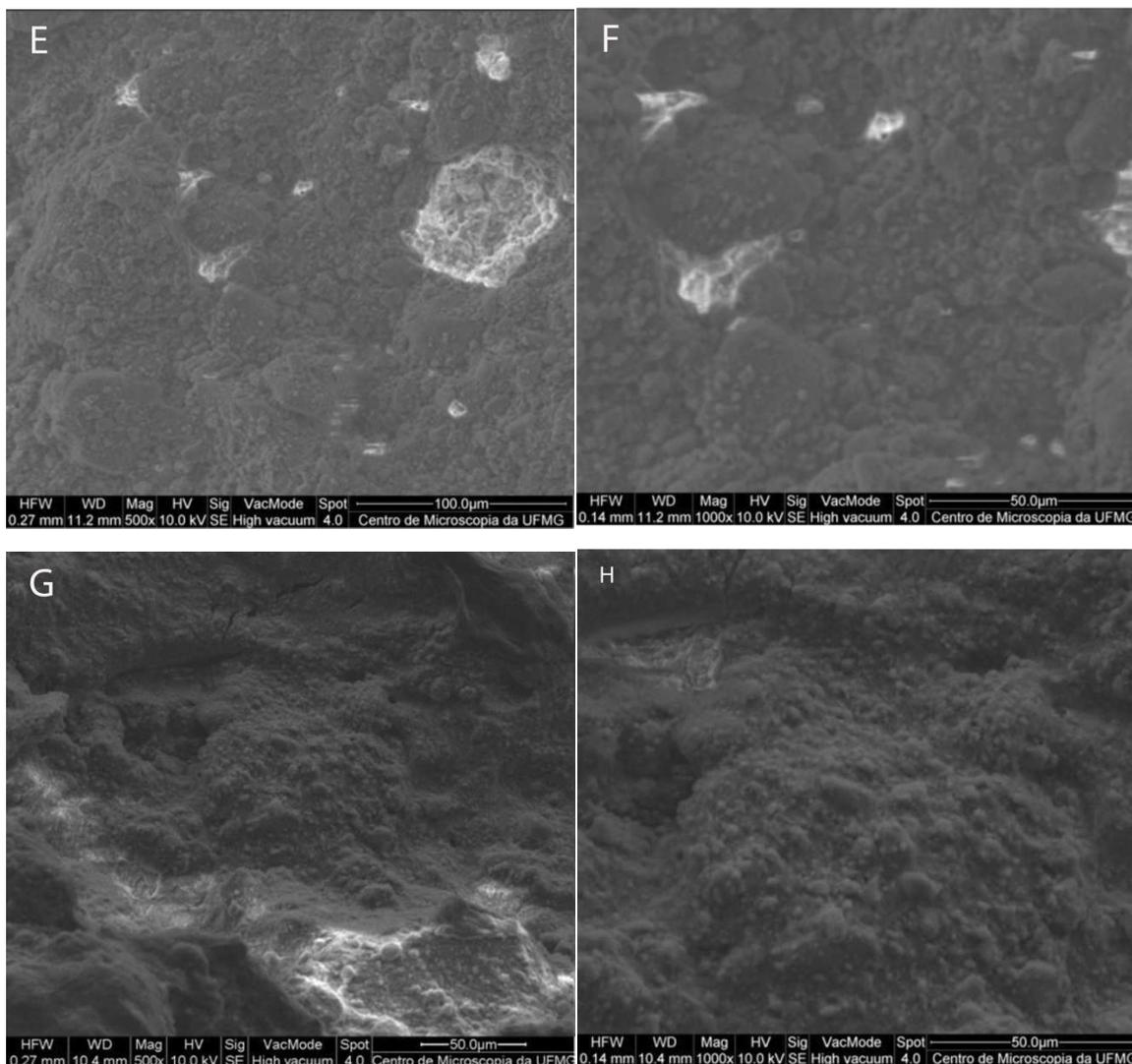
6 RESULTADOS

6.1 Caracterização dos Pós e Cimentos

Os resultados da microscopia podem ser visualizados na Figura 4. As imagens A e B mostram a existência de aglomerados de partículas < 50 micrômetros, resultando numa superfície irregular. Esta condição é típica do processo de produção por precipitação de nanopartículas de HA. As imagens micrográficas de HAC10 (C, D) demonstram a existência de aglomerados de partículas de ≤ 50 micrômetros e uma superfície heterogênea e porosa (Figs 4, B e D). Ao examinar as micrografias dos cimentos CHAP nas imagens (E, F) e dos cimentos CHAC10 (G, H), é possível notar a presença de uma superfície granular; apesar da inclusão de partículas de hidroxiapatitas puras e carbonatadas em ambas as amostras, a rugosidade da superfície é mais homogênea devido à presença de polímero Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) da fase líquida.

Figura 4 - Imagens micrográficas de SEM dos pós e cimentos de HA. (A,B) HAP (C,D) HAC10 (E,F) CHAP (G,H) CHAC10.



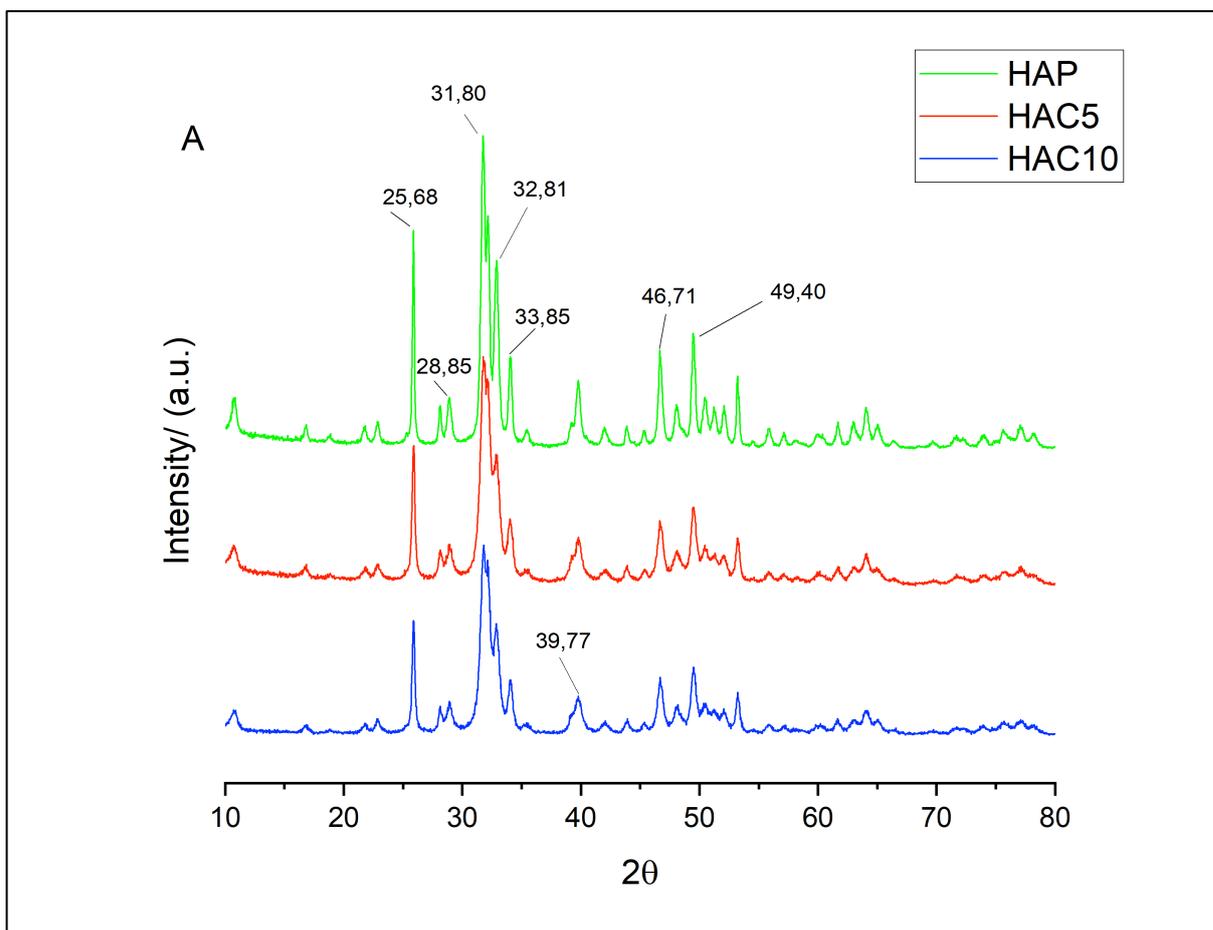


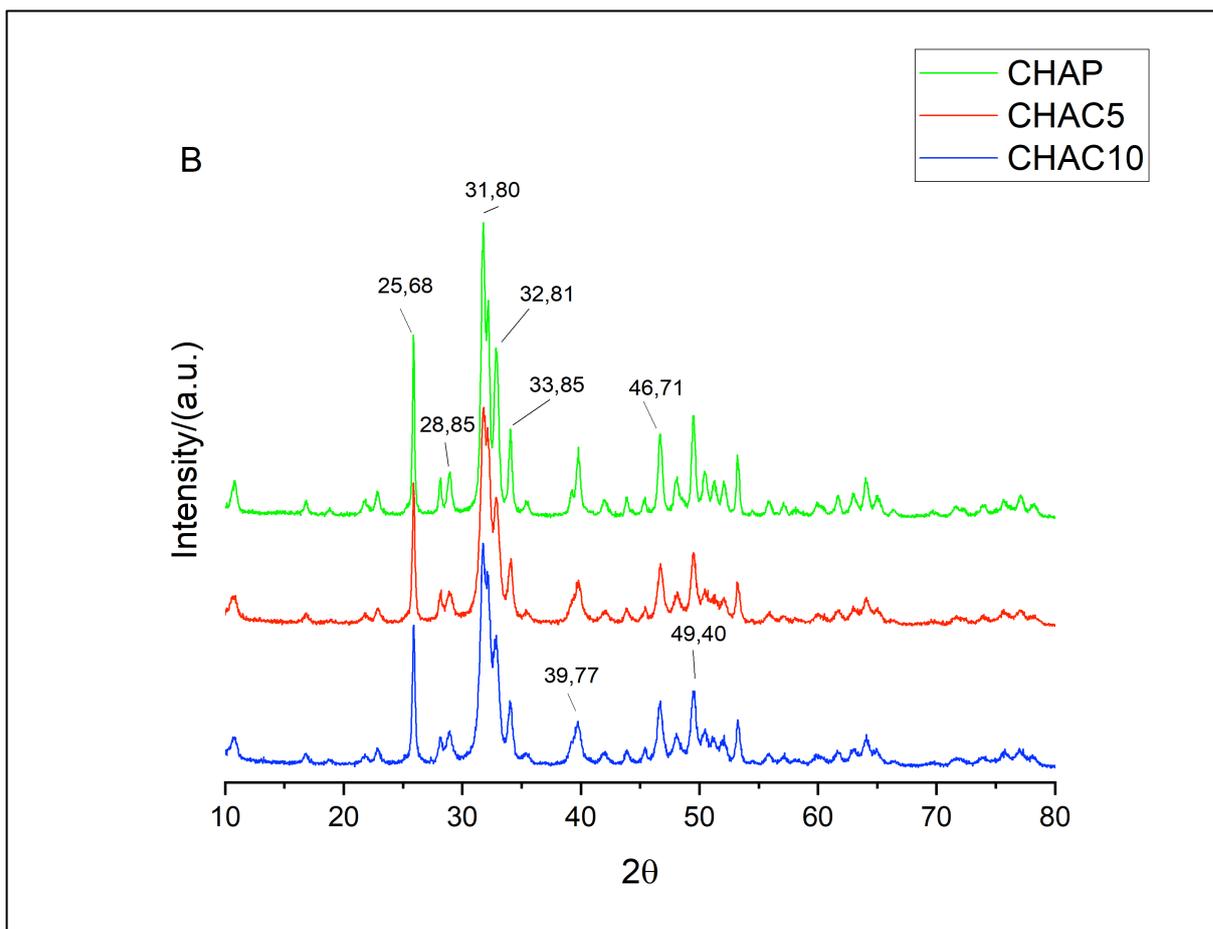
Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

Os padrões das imagens de XRD das Hidroxiapatitas e dos cimentos (Fig.5) estão dentro dos padrões estabelecidos pela ICDD (International Centre for Diffraction Data) para hidroxiapatita. Os picos dos difratogramas se mostraram mais alargados, indicando um baixo grau de cristalinidade. O resultado apresentou picos de difração equivalentes com os da HA estequiométrica em valores de 2θ : 25,68°; 28,85°; 31,80°; 32,81°; 33,85°; 39,77°; 46,71°; e 49,40°.

Observa-se também que à medida que houve aumento da quantidade de íons carbonato, os picos tiveram uma diminuição de intensidade, resultado característico de diminuição da cristalinidade da hidroxiapatita nanoparticulada.

Figura 5 - Difratoogramas dos pós e cimentos de HA (XRD). (A) Pós de HAP, HAC5 e HAC10. (B) Cimentos ósseos de CHAP, CHAC5 e CHAC10.

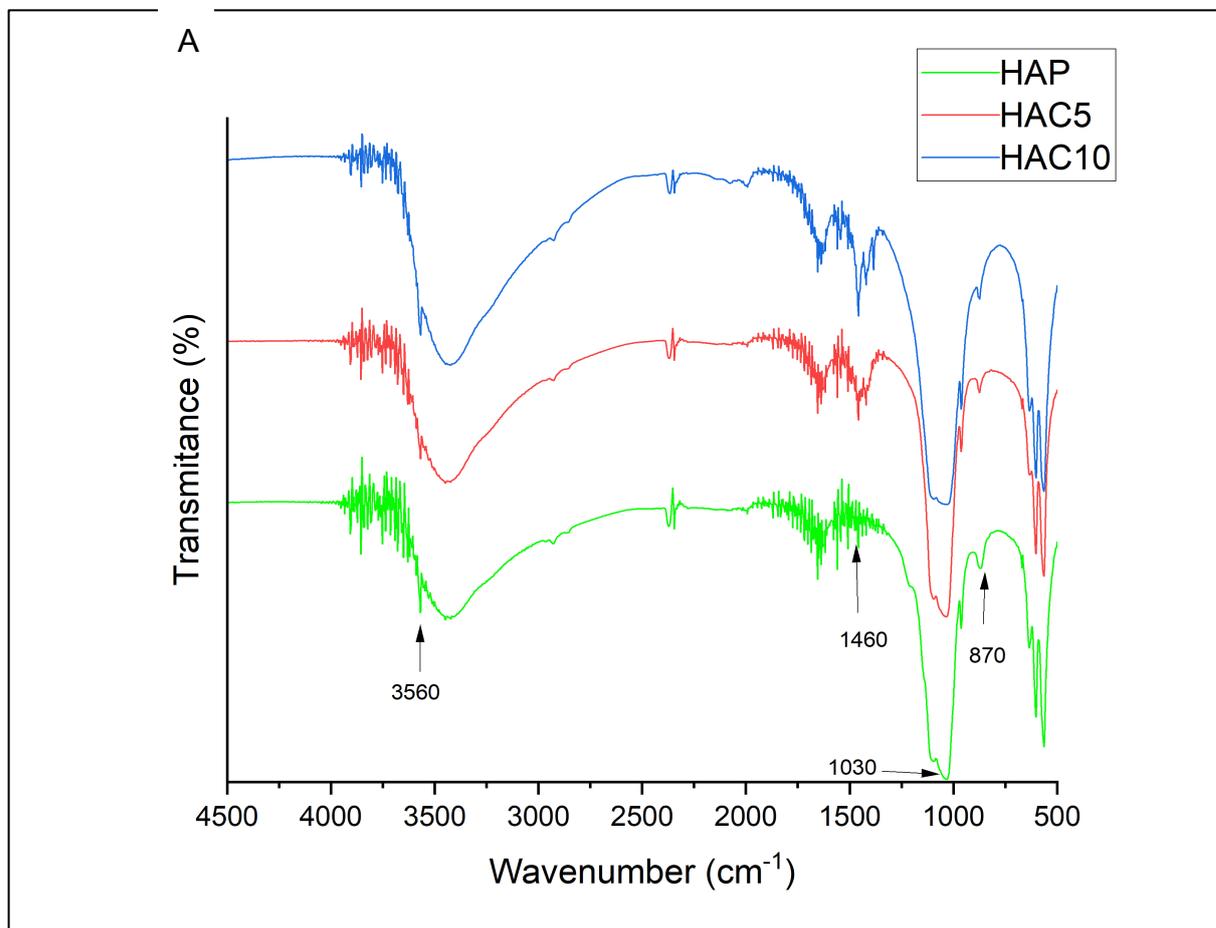


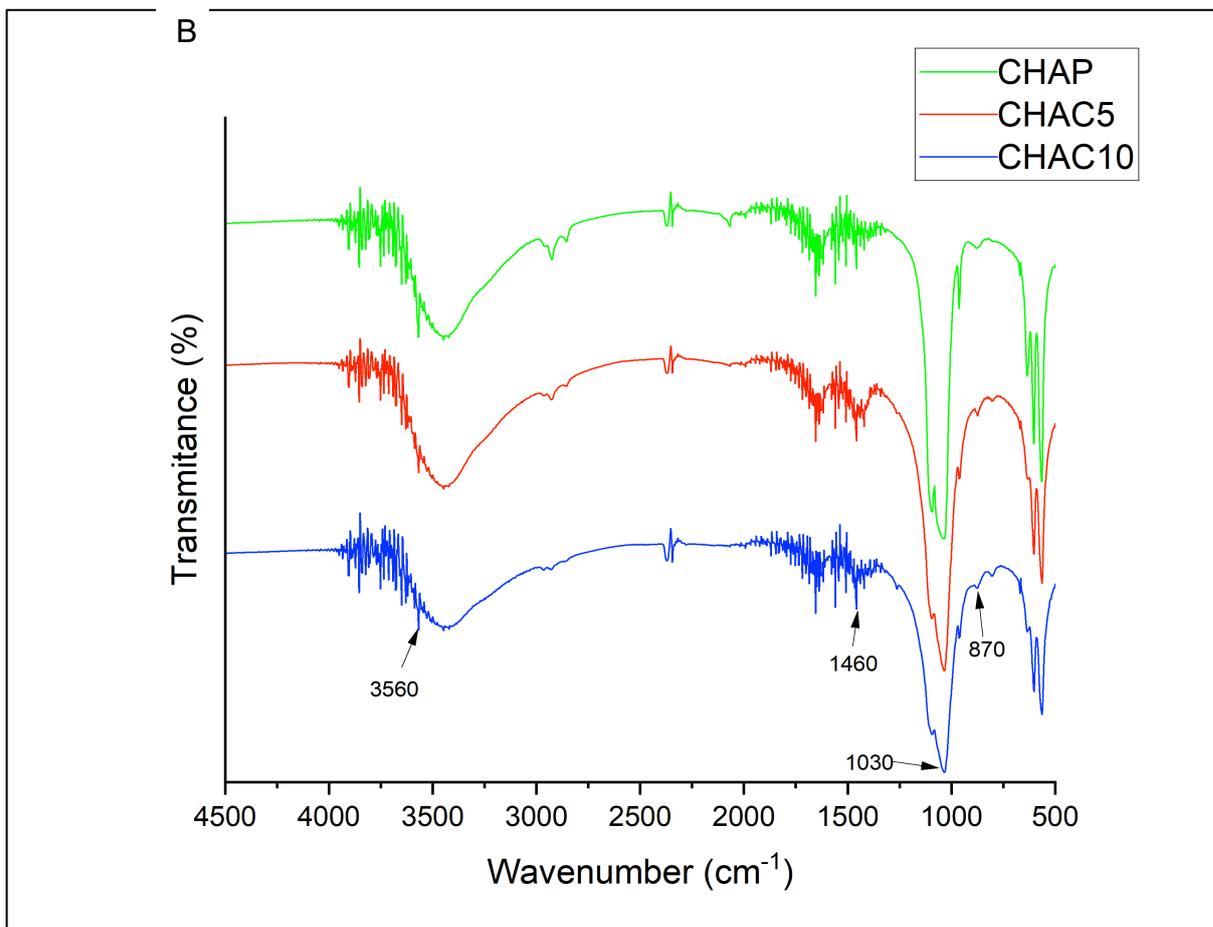


Fonte: Dados da pesquisa, 2024

Os espectros de infravermelho das HAC e dos CHAC apresentaram bandas de absorção características das HA (Fig.6). Em aproximadamente 3560cm^{-1} observou-se a banda de absorção característica de estiramento simétrico do grupo OH^- da HA. As bandas localizadas em 870 cm^{-1} e 1460 cm^{-1} são características do grupo CO_3^{2-} . As bandas apresentadas em 1030 cm^{-1} são provenientes dos íons PO_4^{3-} . Observou-se ainda que as amostras contendo 5 e 10% de carbonato apresentaram transmitância maior quando comparadas com HAP. Poucas diferenças são observadas devido à pequena quantidade de carbonato adicionado às amostras.

Figura 6 - (A) Espectro de FTIR dos pós de HAP, HAC5 e HAC10. (B) Espectro de FTIR dos cimentos ósseos CHAP, CHAC5 e CHAC10.





Fonte: Dados da pesquisa, 2024

6.2 Teste de ângulo de Contato (Molhabilidade)

No período de contato após 1 segundo todos os cimentos apresentaram propriedades hidrofílicas. Contudo, CHAC5 e CHAC10 apresentaram maior potencial hidrofílico quando comparados com CHAP. Após 30 segundos, a hidrofilicidade dos materiais foi corroborada pela redução dos ângulos de contato (Tab.1).

Tabela 1 - Medidas dos ângulos de contato após 1s e 30s

Amostra	Tempo/s	Ângulo de contato/ °
CHAP	1	53,76
	30	45,87
CHAC5	1	42,05
	30	37,13
CHAC10	1	44,15
	30	38,33

Fonte: Dados da pesquisa, 2024

Figura 7 - Imagens dos ângulos de contato de (A) CHAP; (B) CHAC5; e (C) CHAC10



Fonte: Dados da pesquisa, 2024

6.3 Teste de Tempo de Presa

A razão pó/líquido foi definida em 0,6 para a manipulação dos cimentos e realização dos testes.

Tabela 2 - Tempo de presa inicial e final dos cimentos

Amostra	Tempo de presa inicial (min)	Tempo de presa final (min)
CHAP	27	52
CHAC5	25	39
CHAC10	23	38

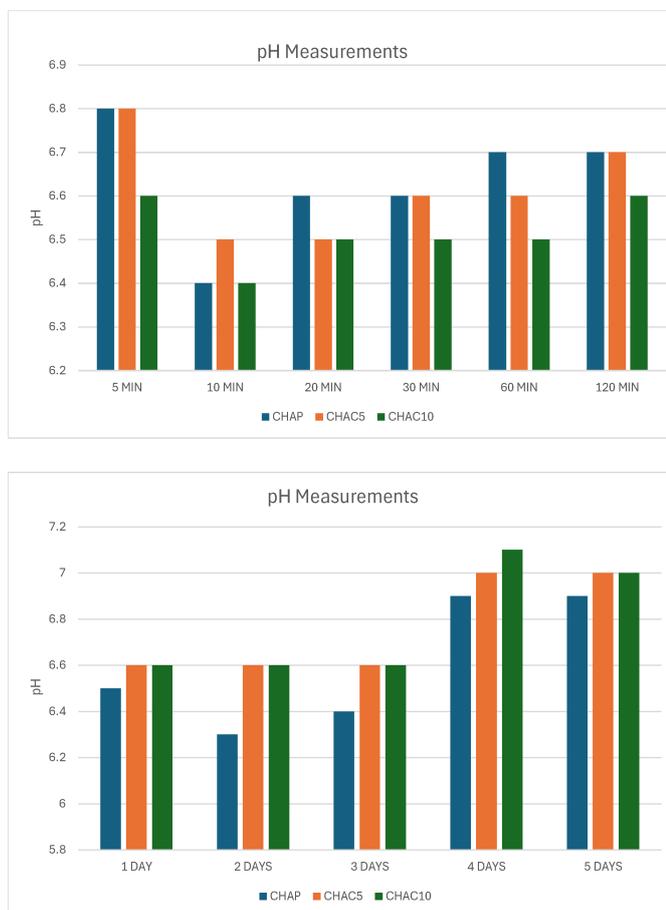
Fonte: Dados da pesquisa, 2024

O tempo de presa inicial foi similar em todas as amostras, com um leve aumento na amostra de CHAP. Em contrapartida, os grupos CHAC5 e CHAC 10 apresentaram uma redução significativa do tempo de presa final comparados com o grupo CHAP (Tab.2).

6.4 Teste de pH

Os valores de pH em todas as amostras tiveram uma queda nos 10 minutos iniciais. Após 20 minutos os valores começaram a aumentar gradativamente nos grupos CHAP e CHAC5, enquanto o grupo CHAC10 se manteve estável até os 60 minutos (Fig. 8-A). Após 1 dia, observou-se diminuição dos valores de todos os grupos, com os grupos CHAC5 e CHAC10 mantendo em 6,6 até o dia 3. Com 4 dias de avaliação os valores aumentaram para o pH 6,9 (CHAP), 7,0 (CHAC5) e 7,1 (CHAC10) (Fig. 8-B).

Figura 8 - (A) Medidas de pH dos cimentos CHAP, CHAC5 and CHAC10 após 120 min. (B) Medidas de pH após 5 dias.



Fonte: Dados da pesquisa, 2024

6.5 Teste de Resistência à Lavagem

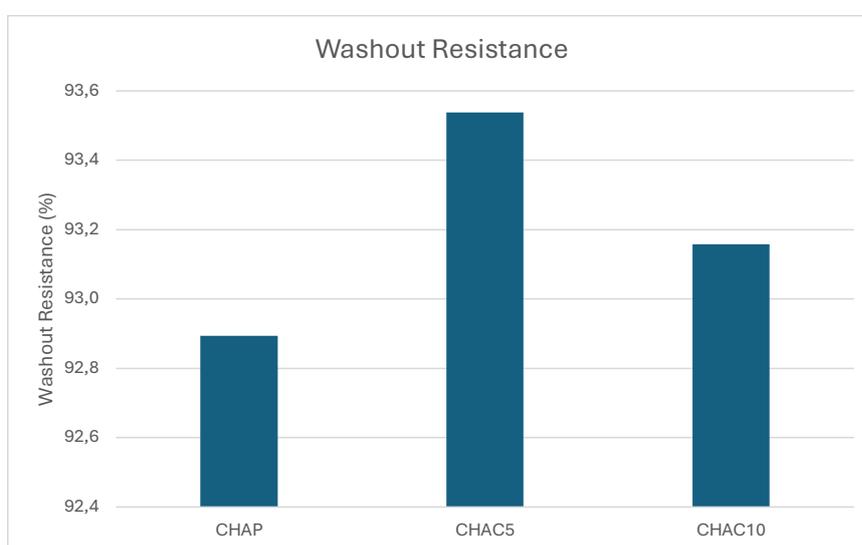
A análise visual não demonstrou nenhuma desintegração visível dos cimentos. Após a secagem do material observou-se pequena perda de massa em todos os grupos. Os grupos CHAC5 e CHAC10 apresentaram resultados de desintegração levemente menores comparados com CHAP (Tab.3; Fig.9).

Tabela 3 - Teste de resistência à lavagem dos cimentos ósseos

Amostras	Inicial	Final	Resistência
	Weight (mg)	Weight (mg) %	
CHAP	197	183	92,9
CHAC5	195	182,4	93,5
CHAC10	190	177	93,2

Fonte: Dados da pesquisa, 2024

Figura 9 - Resistência à lavagem dos grupos CHAP, CHAC5 e CHAC10



Fonte: Dados da pesquisa, 2024

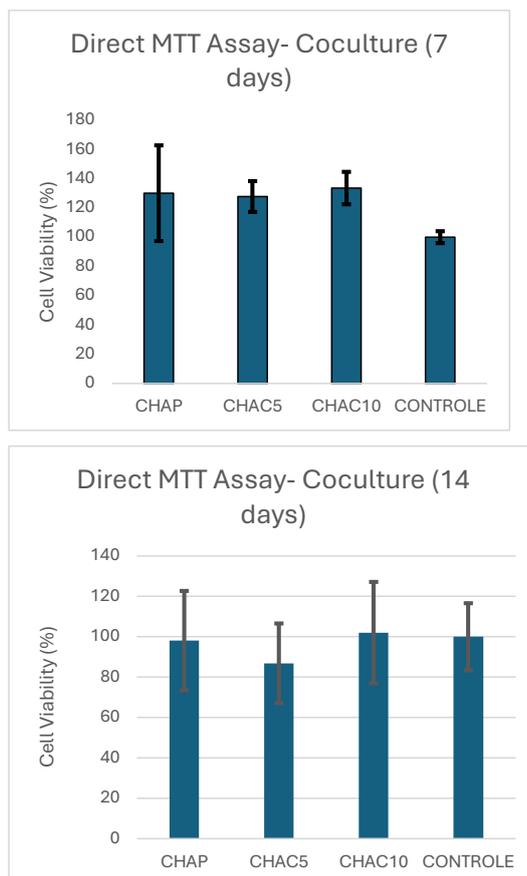
6.6 Testes Biológicos *In Vitro*

6.6.1 Ensaio de MTT

Ao avaliar os resultados do ensaio de MTT direto dos cimentos, observou-se aumento significativo ($p=0,032$) da viabilidade celular nos grupos CHAP, CHAC5 e CHAC10 (Fig.10-A), com uma diferença significativa entre os grupos CHAC10 e CHAP ($p=0,04$). Aos 14 dias, o CHAC10 apresentou viabilidade de 102,05%, enquanto o grupo CHAC5 teve viabilidade de 86,87% (Fig.10-B), não havendo diferenças estatística entre os grupos. O grupo CHAC10 ainda se manteve com viabilidade celular acima de 100%. Com isso, os cimentos não apresentaram citotoxicidade

celular em Cocultura de células MC3T3 e L929, devido a viabilidade sempre estar acima de 70%.

Figura 10 - MTT de contato direto em Cocultura celular de L929 e MC3T3 dos cimentos CHAP, CHAC5, CHAC10 e Grupo Controle por (A) 7 dias e (B) 14 dias.

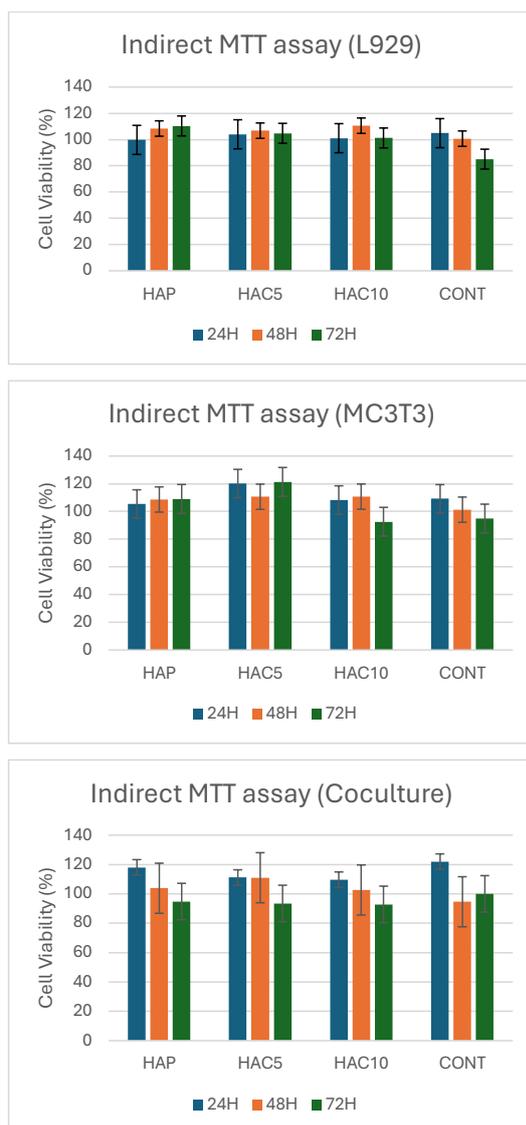


Fonte: Dados da pesquisa, 2024

O teste de citotoxicidade indireto avaliado pelo método de MTT, corroborou com os achados do MTT direto, onde os grupos não apresentaram citotoxicidade celular. No MTT realizado com as células L929, os grupos apresentaram, em 24h, resultados semelhantes ao grupo controle (Fig.11-A), não demonstrando a diferenças estatísticas entre os grupos, em todos os tempos. Em 48h e 72h, os resultados de CHAP, CHAC5 e CHAC10 foram melhores do que o grupo controle (Fig.11-A). Quando em contato com as células MC3T3, os eluatos dos grupos HAC5 apresentaram melhor viabilidade celular em todos os tempos, enquanto HAP e HAC10 tiveram resultados semelhantes ao grupo controle (Fig.11-B), não havendo,

tampouco, diferenças estatísticas significantes entre as amostras dos grupos. Ao analisar os resultados do MTT em Cocultura, os resultados foram semelhantes em todos os grupos (Fig.11-C).

Figura 11 - MTT de contato indireto de HAP, HAC5 e HAC10 em (A) células L929; (B) Células MC3T3; e (C) Cocultura celular



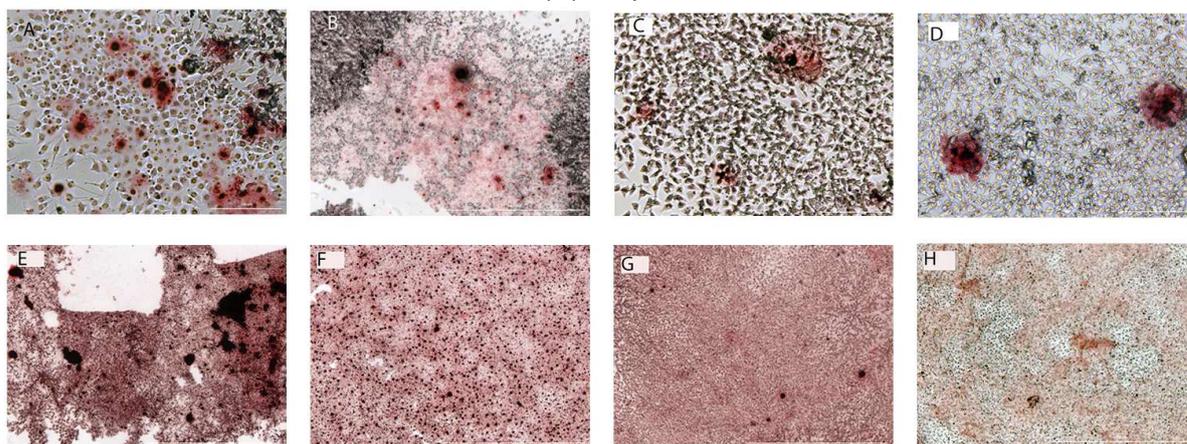
Fonte: Dados da pesquisa, 2024

6.6.2 Teste de Mineralização (Alizarin Red S/ Vermelho de Alizarina)

Os nódulos de calcificação apareceram com a coloração rósea-avermelhada nas imagens microscópicas. Na análise no tempo de 7 dias, observou-se maior quantidade de nódulos no grupo CHAC5, abrangendo extensa área de

mineralização (Fig.12-B). No grupo controle observou-se apenas dois nódulos de calcificação (Fig.12-D), enquanto nos grupos CHAP, CHAC5 e CHAC10 foi possível observar maior quantidade (Fig.12-A;B;C).

Figura 12 - Vermelho de Alizarina S para Mineralização. (A) CHAP – 7 dias. (B) CHAC5 – 7 dias. (C) CHAC10 – 7 dias. (D) Grupo Controle – 7 dias. (E) CHAP – 14 dias. (F) CHAC5 – 14 dias. (G) CHAC10 – 14 dias. (H) Grupo Controle – 14 dias.



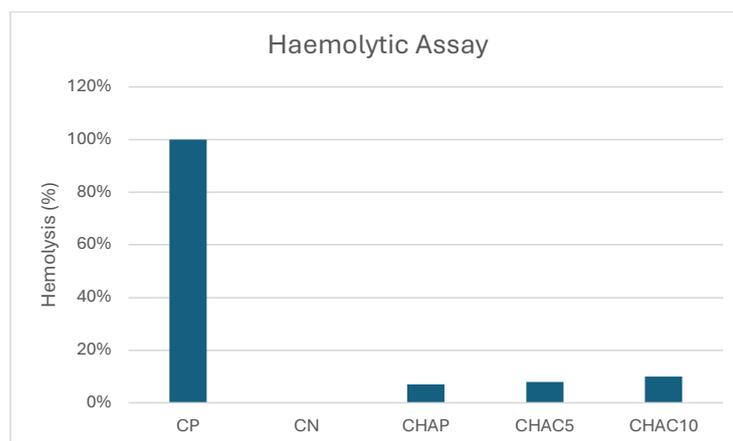
Fonte: Dados da pesquisa, 2024

Os resultados do teste com 14 dias evidenciaram maior área recoberta por calcificação, em todos os grupos. Porém os grupos CHAP, CHAC5 e CHAC10 apresentaram-se com uma coloração mais escura, quando comparado com o grupo controle (Fig.12-E;F;G). Além disso, o grupo CONT apresentou maior área sem calcificação (Fig.12-H).

6.6.3 Teste de Hemólise

O teste de hemólise foi realizado para avaliar se os cimentos poderiam ser utilizados com segurança sem prejudicar as células sanguíneas. O controle positivo (CP) demonstrou dano completo na célula, enquanto o controle negativo (CN), evidenciou que o PBS evitou a lise celular. O percentual de hemólise para os grupos CHAC 5 e CHAC10 foram de 8 e 10% respectivamente. O Grupo CHAP apresentou hemólise de 7% (Fig.13). A análise estatística demonstrou diferença significativa entre os grupos amostrais comparados com o controle positivo ($p < 0,0001$).

Figura 13 - Teste de Hemólise do controle positivo, controle negativo e cimentos ósseos CHAP, CHAC5 e CHAC10



Fonte: Dados da pesquisa, 2024

7 DISCUSSÃO

Este trabalho se propôs a desenvolver um novo tipo de cimento ósseo, com a adição de íons carbonato em Hidroxiapatita nano-particulada para avaliar os resultados da resposta celular frente ao biomaterial. Os resultados mostraram que os cimentos ósseos de hidroxiapatita carbonatada apresentaram excelentes resultados nas células pré-osteoblásticas e pré-fibroblásticas, melhorando viabilidade celular, aumentando potencial de mineralização e não causando a lise das células sanguíneas.

A adição de íons carbonato na composição da hidroxiapatita propiciou uma melhora nas propriedades mecânicas do cimento. A distorção do parâmetro da grade cristalina promove uma alteração da morfologia do pó e do comportamento térmico, sendo diretamente relacionado com o nível de carbonato adicionado na composição (COPETE; LÓPEZ; BAUDIN, 2024b). Adicionalmente a isso, maiores quantidades de íons carbonato substituído na hidroxiapatita resulta em melhor dissolução, cristalinidade reduzida e partículas de tamanhos menores (PEROOS; DU; DE LEEUW, 2006; TAMM; PELD, 2006). Concordantemente com esses trabalhos, os resultados encontrados corroboram com as afirmações realizadas previamente, com aglomerados de partículas menores que 2 μm , tempo de presa reduzido, melhor comportamento no teste de resistência a lavagem, além dos resultados obtidos nos testes biológicos. É sabido que as apatitas biológicas não são tão cristalinas, e o motivo é a presença de carbonato em sua rede. Portanto, a adição desses íons na HA resulta em um papel essencial no desenvolvimento do biomaterial, gerando um produto de cristais nanométricos e até mesmo amorfos (BIGI *et al.*, 1992; KALITA; BHATT, 2007).

Para a fase líquida do cimento, a adição de polímero Hidroxipropilmetilcelulose teve como funções a melhora da coesão e resistência à lavagem. Esse polímero já está descrito na literatura para esses fins e sua utilização possibilita melhor manejo das propriedades mecânicas do cimento (BOHNER, MARC, 2010; HABLEE *et al.*, 2017a; ZHANG *et al.*, 2014). Além da coesão e resistência à lavagem, o tempo de presa e as propriedades mecânicas são aprimoradas com a inclusão do Polímero hidroxipropilmetilcelulose.

A aglomeração das partículas de HAP e HAC gerando uma superfície irregular é característica típica do método de síntese por precipitação de nanopartículas de HA. Estudos prévios mostraram a caracterização através de MEV encontrando imagem microscópica semelhante ao do presente estudo, onde as partículas de HA apresentaram-se em aglomerados de 2 μ m, formando diversas cadeias de hidroxiapatita de tamanho nanométrico (RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007). Outra pesquisa obteve HA a 100°C por 12h, sendo capaz de formar aglomerações de vários formatos, tamanhos e cristalitos, apresentando também a capacidade de aglomeração e propiciando a formação de microporos entre as partículas, permitindo melhor penetração dos fluidos fisiológicos, favorecendo a adesão do biomaterial com o tecido ósseo neoformado, conseqüentemente, a osseointegração (COSTA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2005). Outro trabalho encontrou resultado onde os aglomerados de hidroxiapatita carbonatada se apresentaram em microesferas contendo 425-600 μ m, resultado semelhante ao encontrado no nosso trabalho (MOURÃO *et al.*, 2019). A adição de HPMC contribuiu para uma superfície mais homogênea dos cimentos facilitando a deposição celular e a osteointegração. Os compósitos favorecem diferentes tempos de degradação dos seus componentes, criando porosidades que são favoráveis para a angiogênese e osteogênese.

Os difratogramas obtidos corroboram com os achados encontrados por Li e colaboradores, onde os picos das nHAs substituídas se apresentam levemente menores quando comparados com os picos da HAP, tendo como possível justificativa para a diminuição da cristalinidade das partículas, a incorporação de íons carbonato (SHUANG LI *et al.*, 2018). Os picos das nHAs substituídas apresentam-se ligeiramente diminuídos, devido às características intrínsecas do método de síntese HAP e substituídas (COX *et al.*, 2014). Foi possível observar que o aumento da concentração de íons carbonato gerou redução progressiva da cristalinidade. Essa diminuição da cristalinidade foi observada por Dias *et al.*, em 2023, onde a adição de íons de Sr, Mg e Zn ocasionou diminuição dos picos dos difratogramas (DIAS *et al.*, 2023).

O espectro de FT-IR encontrado nos pós e cimentos, vão de acordo com as bandas assimiladas nos trabalhos de Dias *et al.* 2023, Ruiz *et al.* 2023, com espectros semelhantes ao da HA, porém com alterações nos picos de intensidade e pequenos deslocamentos de bandas. Essas modificações nos espectros dos pós e

cimentos podem estar relacionadas com a maior concentração de íons carbonato na rede de grupos funcionais (DIAS *et al.*, 2023; RUIZ *et al.*, 2023).

Os cimentos apresentaram-se hidrofílicos, criando uma superfície favorável para a adesão celular. O equilíbrio da superfície nos compósitos é favorável ao criar uma área não muito hidrofílica, nem muito hidrofóbica, melhorando adsorção proteica e criando ambiente propício para espalhamento de osteoblastos. Em pesquisa *in vivo* realizada com animais, foi possível observar que os grupos que utilizaram compósitos para regeneração de defeitos alveolares criaram trabéculas mais maduras e organizadas comparados com os que não utilizaram, melhorando a qualidade do osso neoformado (LOPES *et al.*, 2024).

A adição de íons carbonato nos cimentos à base de hidroxiapatita, bem como a utilização do polímero HPMC, promoveram uma diminuição significativa do tempo de presa final, ao passo que o tempo de presa inicial teve uma ligeira redução, apresentando o tempo de 39 minutos para CHAC5 e 38 minutos para CHAC10. Esse resultado corrobora o resultado da literatura, ocorrendo a diminuição do tempo de presa à medida que a concentração de carbonato aumenta, devido a dissolução e precipitação que ocorre durante o tempo de presa. Idealmente, o tempo de presa deve ser estabelecido entre 15 e 25 minutos (QI *et al.*, 2013; RUIZ *et al.*, 2023). Baseado nessa evidência, foi possível observar que os cimentos a base de hidroxiapatita carbonatada apresentaram resultados acima dos tempos de presa final ideais, mas em contrapartida, provavelmente pela presença do polímero HPMC na fase líquida, os cimentos apresentaram boa resistência à degradação, evitando a desintegração do cimento quando em contato com os fluidos fisiológicos. De modo geral, o tempo de presa rápido limita o período de trabalho, à medida que o cimento se torna impróprio para a sua utilização antes do término do procedimento. Tempo de presa mais lento pode gerar um retardo do procedimento, levando-se em conta a impossibilidade de finalizar o procedimento enquanto o tempo de presa final não for atingido (HABLEE *et al.*, 2017b).

O comportamento do pH de uma forma geral mostrou uma pequena diminuição nos minutos iniciais, mantendo-se neutro na maior parte do tempo, sendo característica fundamental para a biocompatibilidade do compósito em contato com as células. O pH das amostras de CHAP, CHAC5 e CHAC10 se mantiveram acima de 6,3 atingindo o pico máximo de 7,1. Esse resultado é mais promissor quando comparado com achados da literatura, onde mostram que o pH se mantendo acima

de 4,2 corresponde a cimentos de apatita (GINEBRA *et al.*, 2012; RUIZ *et al.*, 2023). A ligeira diminuição do pH nos minutos iniciais nos grupos CHAC5 e CHAC10 pode ter ocorrido devido a liberação de íons de carbonato e fosfato durante a fase de dissolução na consolidação dos cimentos. Essa diminuição do valor pode ser atribuída pela presença dos íons carbonato não reagidos, enquanto o caráter básico dos íons fosfato mantiveram esse intervalo de valores dentro de um nível de neutralidade do pH (RUIZ *et al.*, 2023). O aumento do pH no tempo até 120min pode ser considerado um fator positivo das amostras, podendo estar relacionado com a melhora da adesão e atividade celular, e à homeostase (DIAS *et al.*, 2023; LEE *et al.*, 2019).

Os modelos celulares utilizados para os testes biológicos foram definidos pelo fato de apresentarem repercussão no processo de reparação tecidual, bem como no processo de cicatrização de feridas, no caso da linhagem celular L929, e para avaliar o potencial de proliferação celular óssea, quando em se tratando das células MC3T3. A proliferação celular é um indicativo excelente da biocompatibilidade do material *in vitro* (LOZANO *et al.*, 2013). Estudos prévios realizados sobre hidroxiapatita carbonatada mostraram que o biomaterial apresenta excelente biocompatibilidade, além de ser capaz de promover a proliferação de fibroblastos e osteoblastos. Apesar dos inúmeros trabalhos envolvendo hidroxiapatita carbonatada, poucos utilizaram testes biológicos com osteoblastos e fibroblastos em Cocultura, embora já foi demonstrado que a Cocultura é capaz de mimetizar os nichos teciduais, favorecendo a regeneração *in situ* via recrutamento de células endógenas, estimulando o processo de autoreparação (LI *et al.*, 2020). A união dessas células gera um efeito sinérgico na maturação e neoformação óssea, melhorando a comunicação entre as células, criando a matriz extracelular. A matriz extracelular secretada por múltiplas células em tecidos e órgãos cria naturalmente uma rede fibrosa de proteínas glicosaminoglicanos e proteoglicanos precisamente arranjados de forma organizada com uma arquitetura 3D que provê um microambiente local especializado (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). Um ensaio com a utilização de nano hidroxiapatita dopada com flavonóide em uma tricultura celular envolvendo osteoblastos, osteoclastos e células endoteliais, resultou em uma melhora do microambiente da regeneração óssea e melhora no processo de microangiogênese, fundamental para a formação de novo osso (FORTE *et al.*, 2016).

No ensaio de MTT, a resposta celular frente aos compostos estudados mostra que o cimento à base de hidroxiapatita carbonatada apresentou resultado

positivo, enquanto a utilização de cimento de fosfato de cálcio dopado com estrôncio e magnésio, em grandes quantidades, apresentaram uma diminuição da viabilidade celular (ARKIN *et al.*, 2021). Outro trabalho realizou o ensaio de MTT em células MC3T3 em contato com hidroxiapatita dopada com prata, e obteve uma viabilidade celular reduzida quando comparada com os achados do nosso trabalho (SIRAIT *et al.*, 2022). Outra pesquisa executou o teste de citotoxicidade utilizando HAC e os resultados corroboraram os dados encontrados no presente estudo, com aumento considerável da viabilidade celular de MC3T3 em contato com os andaimes do material (SARI *et al.*, 2021; SIRAIT *et al.*, 2022).

A hemólise é a destruição prematura das hemácias (glóbulos vermelhos) por rompimento da membrana plasmática, favorecendo o extravasamento de componentes intracelulares como hemoglobina, retardando o processo de cicatrização e migração celular, importantes para a cascata de regeneração. No presente estudo, os resultados dos grupos CHAC5 e CHAC10 foram similares ao grupo CHAP, evidenciando o potencial de integralidade celular em contato com as amostras, além de suportar o fenômeno de compatibilidade com o sangue. Pesquisa realizada com quitosana e magnésio dopadas em Hidroxiapatita também apresentou como resultado a manutenção da integridade da membrana celular das hemácias, podendo ser utilizado no corpo humano (BHOWMICK *et al.*, 2018).

A fase mineral do tecido ósseo formada pela apatita biológica sustenta a relação entre os mecanismos físico-químicos e bioquímicos, extremamente necessários para a formação dos minerais precursores para a nucleação do acúmulo de íons fosfato e cálcio, bem como para a facilitação de formação e acúmulo de colágeno e hidroxiapatita nos defeitos ósseos. Analisando os dados dos testes de mineralização, CHAC5 e CHAC10 foram capazes de produzir mineralização em tempo menor quando comparados com o grupo controle. Uma melhora na deposição de cálcio na presença de hidroxiapatita dopada com carbonato e magnésio foi relatada em estudo prévio, apresentando resultado similar ao encontrado no teste realizado na presente pesquisa (DIAS *et al.*, 2023; GUARINO *et al.*, 2014). O teste de Vermelho de Alizarina sinalizou a importância dos cimentos de fosfato de cálcio, especialmente com a presença de hidroxiapatita carbonatada, na indução da mineralização *in vitro* (GUARINO *et al.*, 2014). Esse resultado pode ser influenciado pela variação de cristalinidade detectável nas diferentes formas de fosfato de cálcio (CELOTTI *et al.*, 2006).

Os resultados promissores envolvendo o biomaterial estudado, servem de parâmetro para a realização de novos estudos acerca dos testes biológicos *in vitro* realizados nessa pesquisa. Com isso, se faz necessário o desenvolvimento de novos projetos para embasar melhor os achados encontrados, e desenvolver uma pesquisa para avaliar os efeitos do material *in vivo*.

Como perspectivas futuras abrangendo esse tema, faz-se necessário realizar mais estudos abordando as respostas biológicas *in vitro* e *in vivo* para avaliar mais profundamente e comparativamente os efeitos da utilização dos cimentos de hidroxiapatita como cimento ósseo voltado para regeneração, bem como da utilização de polímeros na composição da pasta. Após a comprovação científica da eficácia e eficiência do compósito, o delineamento de um ensaio clínico para avaliação dos resultados do cimento traria grandes avanços para a comunidade científica que almeja melhores resultados quando o assunto é regeneração óssea.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, foi possível observar que os cimentos a base de hidroxiapatita carbonatada apresentaram resultados promissores para a regeneração óssea, aumentando a viabilidade celular e estimulando mineralização sem causar hemólise. Os resultados dos testes realizados também corroboram para melhor compreensão e bioatividade do compósito desenvolvido. Em conjunto, os resultados encontrados servem de base para evidenciar as características ideais físico-químicas e biológicas do desempenho do novo compósito que permitirá sua utilização em estudos *in vivo*, e obtenção de materiais para a engenharia de tecidos.

REFERÊNCIAS

- ARCHUNAN, M W; PETRONIS, S. Bone Grafts in Trauma and Orthopaedics. *Cureus*, 4 set. 2021.
- ARKIN, VHR *et al.* Characterization and in Vitro Evaluations of Injectable Calcium Phosphate Cement Doped with Magnesium and Strontium. *ACS Omega*, v. 6, n. 4, p. 2477–2486, 2 fev. 2021.
- BAHROM, H *et al.* Controllable Synthesis of Calcium Carbonate with Different Geometry: Comprehensive Analysis of Particle Formation, Cellular Uptake, and Biocompatibility. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 7, n. 23, p. 19142–19156, 2 dez. 2019.
- BATTAFARANO, G *et al.* Strategies for bone regeneration: From graft to tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. [S.l.]: MDPI AG. , 1 fev. 2021
- BAUDÍN, C; PENA, P. Review: Tailored microstructures in the system tricalcium phosphate-wollastonite-diopside for bone regeneration scaffolds. *Open Ceramics*, v. 16, 1 dez. 2023.
- BHARADWAZ, A; JAYASURIYA, A C. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 maio 2020
- BHOWMICK, A; *et al.* Organically modified clay supported chitosan/hydroxyapatite-zinc oxide nanocomposites with enhanced mechanical and biological properties for the application in bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, p. 11–19, 1 jan. 2018.
- BIGI, A *et al.* Calcified Tissue International The Role of Magnesium on the Structure of Biological Apatites. *Calcif Tissue Int*. [S.l.: s.n.], 1992.
- BIGI, A *et al.* Chemical and Structural Characterization of the Mineral Phase from Cortical and Trabecular Bone. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 68, n. 1, p. 45–51, 1997.
- BOHNER, M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *European Spine Journal*, v. 10, n. SUPPL. 2, 2001.
- BOHNER, M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. *European Cells and Materials*, v. 20, p. 1–12, 2010.
- BOSE, S *et al.* Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends in Biotechnology*, v. 31, p. 594–605, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.06>>.
- BUSCH, A *et al.* Functionalization of synthetic bone substitutes. *International Journal of Molecular Sciences*. [S.l.]: MDPI. , 1 maio 2021

CELOTTI, G *et al.* Crystallinity in apatites: How can a truly disordered fraction be distinguished from nanosize crystalline domains? nov. 2006, [S.l.: s.n.], nov. 2006. p. 1079–1087.

COPETE, H; LÓPEZ, E; BAUDIN, C. Synthesis and characterization of B-type carbonated hydroxyapatite materials: Effect of carbonate content on mechanical strength and in vitro degradation. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 2024a.

CORNO, M *et al.* In Silico Study of Hydroxyapatite and Bioglass®: How Computational Science Sheds Light on Biomaterials. *Biomaterials - Physics and Chemistry*. [S.l.]: InTech, 2011.

COSTA, A C F M *et al.* Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 4, n. 3, p. 29–38, 2009. Disponível em: <www.dema.ufcg.edu.br/revista>.

COX, S C. *et al.* Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. *Materials Science and Engineering C*, v. 35, n. 1, p. 106–114, 2014.

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*, v. 1830, n. 11, p. 5014–5026, 2013.

DIAS, A M *et al.* Magnesium (Mg²⁺), Strontium (Sr²⁺), and Zinc (Zn²⁺) Co-substituted Bone Cements Based on Nano-hydroxyapatite/Monetite for Bone Regeneration. *Biological Trace Element Research*, v. 201, n. 6, p. 2963–2981, 1 jun. 2023.

ELIAZ, N; METOKI, N. Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials*, v. 10, n. 4, 24 mar. 2017.

EVIS, Z.; WEBSTER, T. J. *Nanosize hydroxyapatite: Doping with various ions. Advances in Applied Ceramics*. [S.l.: s.n.], jul. 2011

FARRÉ-GUASCH, E *et al.* Human maxillary sinus floor elevation as a model for bone regeneration enabling the application of one-step surgical procedures. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. [S.l.: s.n.], 1 fev. 2013

FLORENCIO-SILVA, R *et al.* Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*. [S.l.]: Hindawi Publishing Corporation., 2015

FORTE, L *et al.* Antioxidant and bone repair properties of quercetin-functionalized hydroxyapatite: An in vitro osteoblast-osteoclast-endothelial cell co-culture study. *Acta Biomaterialia*, v. 32, p. 298–308, 1 mar. 2016.

GINEBRA, M P *et al.* Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [S.l.: s.n.], set. 2012

GUARINO, V *et al.* MgCHA particles dispersion in porous PCL scaffolds: In vitro mineralization and in vivo bone formation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 8, n. 4, p. 291–303, 2014.

GUTIERRES, M *et al.* Substitutos Ósseos Conceitos Gerais e Estado Actual. *Arquivos de Medicina*, v. 19, n. 4, p. 153–162, 2006.

HABLEE, S *et al.* Calcium phosphate cement for bone filler applications. *Journal of Advanced Research in Materials Science*, v. 39, p. 20–31, 2017a. Disponível em: <www.akademiabaru.com/arms.html>.

HANDRINI DEWI, A; DEWI ANA, I. The use of hydroxyapatite bone substitute grafting for alveolar ridge preservation, sinus augmentation, and periodontal bone defect: A systematic review. *Heliyon*, v. 4, p. 884, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00884>>.

HJØRTING-HANSEN, E. Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery. A historical review. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG*, v. 6, n. 1, p. 6–14, 2002.

HOU, X *et al.* Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 13, n. 187, 2022.

HUSSEY, G S.; DZIKI, J L.; BADYLAK, S F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nature Reviews Materials*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 jul. 2018

IGETA, K *et al.* Morphological and functional changes in RAW264 macrophage-like cells in response to a hydrated layer of carbonate-substituted hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 105, n. 4, p. 1063–1070, 1 abr. 2017.

ELLIOTT, JC. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. London: Department of Child Dental Health, The London Hospital Medical College, 1994. v. 18.

JIA, X *et al.* The polycaprolactone/silk fibroin/carbonate hydroxyapatite electrospun scaffold promotes bone reconstruction by regulating the polarization of macrophages. *Regenerative Biomaterials*, v. 9, 2022.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa. *Histologia básica I*. 12 .ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KALITA, S J.; BHATT, H A. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering C*, v. 27, n. 4, p. 837–848, 16 maio 2007.

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

KOMORI, T. Functions of osteocalcin in bone, pancreas, testis, and muscle. *International Journal of Molecular Sciences*. [S.l.]: MDPI AG. , 2 out. 2020

LEE, J *et al.* Current Advances in Immunomodulatory Biomaterials for Bone Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*. [S.l.]: Wiley-VCH Verlag. , 21 fev. 2019

LI, M *et al.* Osteoblast/fibroblast coculture derived bioactive ECM with unique matrisome profile facilitates bone regeneration. *Bioactive Materials*, v. 5, n. 4, p. 938–948, 1 dez. 2020.

LIU, W *et al.* A novel injectable, cohesive and toughened Si-HPMC (silanized-hydroxypropyl methylcellulose) composite calcium phosphate cement for bone substitution. *Acta Biomaterialia*, v. 10, n. 7, p. 3335–3345, 2014.

LOPES, B S B *et al.* EFFECT OF CALCIUM PHOSPHATE COMPOSITE WITH DOXYCYCLINE AS A GRAFT FOR BONE DEFECT. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 15, n. 6, p. 1000, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.15>>.

LOPES, MAFS. *Glass reinforced hydroxyapatite composites*. 1999. 1–189 f. Universidade do Porto, Porto, 1999.

LOZANO, R M *et al.* Response of MC3T3-E1 osteoblasts, L929 fibroblasts, and J774 macrophages to fluoride surface-modified AZ31 magnesium alloy. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 101, n. 10, p. 2753–2762, out. 2013.

MANTSOPOULOS, K *et al.* Hydroxyapatite bone cement in the reconstruction of defects of the long process of the incus: Personal experience and literature review. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*, v. 42, n. 4, 1 jul. 2021.

MOHD PU'AD, N. A.S. *et al.* Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. *Heliyon*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 maio 2019

MOLLY, L *et al.* Bone Formation Following Implantation of Bone Biomaterials Into Extraction Sites. *Journal of Periodontology*, v. 79, n. 6, p. 1108–1115, jun. 2008.

MOURÃO, CFAB *et al.* Does the association of blood-derived growth factors to nanostructured carbonated hydroxyapatite contributes to the maxillary sinus floor elevation? A randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, v. 23, n. 1, p. 369–379, 29 jan. 2019.

PANDA, S; BISWAS, C K; PAUL, S. A comprehensive review on the preparation and application of calcium hydroxyapatite: A special focus on atomic doping methods for bone tissue engineering. *Ceramics International*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 15 out. 2021

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. 1–20, 1 dez. 2012.

PERMATASARI, H. A.; YUSUF, Y. Characteristics of Carbonated Hydroxyapatite Based on Abalone Mussel Shells (*Haliotis asinina*) Synthesized by Precipitation Method with Aging Time Variations. 1 jul. 2019, [S.l.]: Institute of Physics Publishing, 1 jul. 2019.

PEROOS, S; DU, Z; DE LEEUW, N H. A computer modelling study of the uptake, structure and distribution of carbonate defects in hydroxy-apatite. *Biomaterials*, v. 27, n. 9, p. 2150–2161, mar. 2006.

QI, X *et al.* Development and characterization of an injectable cement of nano calcium-deficient hydroxyapatite/multi(amino acid) copolymer/calcium sulfate hemihydrate for bone repair. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 4441–4452, 21 maio 2013.

QU, Y *et al.* Bone cements for therapy and regeneration for minimally invasive treatment of neoplastic bone defects. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 9, n. 21, p. 4355–4364, 7 jun. 2021.

RATNAYAKE, J T.B.; MUCALO, Michael; DIAS, George J. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. [S.l.]: John Wiley and Sons Inc. , 1 jul. 2017

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 Patologia Oral y Cirugia Bucal*. [S.l.]: Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal. , 1 mar. 2016

RIGO, ECS; GEHRKE, S A; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. *Rev. Dental Press Periodontia Implantol.*, v. 1, n. 3, p. 39–50, jul. 2007.

RUIZ, J *et al.* Calcium phosphate cements improved by addition of carbonated Hydroxyapatite type B. *Boletín de la Sociedad Espanola de Ceramica y Vidrio*, v. 62, n. 4, p. 315–328, 1 jul. 2023.

SALAM, N; GIBSON, Iain R. Lithium ion doped carbonated hydroxyapatite compositions: Synthesis, physicochemical characterisation and effect on osteogenic response in vitro. *Biomaterials Advances*, v. 140, 1 set. 2022.

SAMAVEDI, S; WHITTINGTON, A R.; GOLDSTEIN, A S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomaterialia*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 2013

SANTOS, M. L. *et al.* Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. *Eclética Química*, v. 30, n. 3, p. 29–35, set. 2005.

SARI, M *et al.* Porous carbonated hydroxyapatite-based paraffin wax nanocomposite scaffold for bone tissue engineering: A physicochemical properties and cell viability assay analysis. *Coatings*, v. 11, n. 10, 1 out. 2021.

SHAKIBAIE-M, B. Comparison of the Effectiveness of Two Different Bone Substitute Materials for Socket Preservation After Tooth Extraction: A Controlled Clinical Study. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, v. 33, n. 2, p. 223–228, mar. 2013.

SHEIKH, Z; *et al.* Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. *Materials*. [S.l.]: MDPI AG. , 2015

SHUANG L; *et al.* Evaluation of highly carbonated hydroxyapatite bioceramic implant coatings with hierarchical micro-/nanorod topography optimized for osseointegration. *International Journal of Nanomedicine*, v. 13, p. 3643–3659, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S159989>>. Acesso em: 12 set. 2022.

SIRAIT, M. *et al.* Characterization of hydroxyapatite by cytotoxicity test and bending test. 18 fev. 2022, [S.l.]: Institute of Physics, 18 fev. 2022.

TAMM, T; PELD, M. Computational study of cation substitutions in apatites. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 179, n. 5, p. 1581–1587, maio 2006.

TANG, P F; *et al.* Development, characterization, and validation of porous carbonated hydroxyapatite bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, v. 90 B, n. 2, p. 886–893, 2009.

WALMSLEY, G G. *et al.* Stem Cells in Bone Regeneration. *Stem Cell Reviews and Reports*. [S.l.]: Humana Press Inc. , 1 out. 2016

WEBSTER, T J; *et al.* Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*. [S.l.: s.n.], 2000.

WEINER, S. Transient precursor strategy in mineral formation of bone. *Bone*. [S.l.: s.n.], set. 2006

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 and Functional Materials*. [S.l.]: SAGE Publications Ltd. , 1 out. 2019

ZHANG, J *et al.* Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomaterialia*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 2014

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo

Brazilian Oral Research



Evaluation of carbonated hydroxyapatite cement: development, characterization and cytotoxicity

Journal:	<i>Brazilian Oral Research</i>
Manuscript ID	BOR-2024-0391
Manuscript Type:	Original Research Report
Specialties:	Basic Implantodontology and Biomaterials
Category--Select your categories from the MeSH or DeCS lists.:	Bone regeneration, Biocompatible materials, bone cements

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO B — Artigo Submetido

Área temática: Implantodontia básica e Biomateriais

Evaluation of carbonated hydroxyapatite cement: development, characterization and cytotoxicity

Guilherme Luz Campos¹

Richard Alfonso Fills Cerchar²

Leandro Napier de Souza³

Ruben Dario Sinisterra^{2,4}

Maria Esperanza Cortés^{1,2}

¹ Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

² Technological Innovation Graduate Program, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte-MG, 31270-901, Brazil.

³ Department of Surgery, Pathology and Clinic, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte-MG, 31270-901, Brazil.

⁴ Department of Chemistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte-MG, 31270-901, Brazil.

Abstract

The aim of this study is to create carbonate-substituted nanoparticulate hydroxyapatite (HAC) and produce a carbonated hydroxyapatite bone cement (CHAC). The initial substances and cements were synthesized and subjected to physicochemical analysis. Subsequently, they were tested in a laboratory setting using a cell coculture of L929 and MC3T3. The study examined four samples: pure hydroxyapatite cement (CHAP), CHAC with 5% carbonate (CHAC5), CHAC with 10% carbonate (CHAC10), and a control group (CONT). The characterization was assessed using scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), contact angle measurements, pH testing, setting time analysis, and wash resistance testing. The cytotoxicity was assessed using the MTT test, mineralization, and hemolysis. The characterization of the CHAC yielded results consistent with those reported in the literature, indicating decreased crystallinity peaks and increased solubility of the sample. However, the cement did not disintegrate when dissolved. Furthermore, it was demonstrated to possess hydrophilic properties and exhibited a pH that is suitable for its application in bone regeneration. During the biological experiments, CHAC exhibited enhanced cell viability and promoted mineralization, without inducing cell hemolysis. Carbonated hydroxyapatite-based cements shown encouraging outcomes in promoting bone regeneration and enhancing cell viability. The test findings indicate that the developed biomaterial created a conducive environment for bone regeneration.

Keywords: Bone Regeneration; Biocompatible Materials; Bone Cements

Introduction

Bone substitutes are biomaterials that have been proved to be beneficial in promoting bone repair. They try to promote bone tissue regeneration by encouraging self-degradation, allowing it to be replaced with newly produced bone. In recent years, numerous biomaterials have been investigated in an attempt to control cellular activity, including those involved in bone tissue regeneration. As a result, some bone cements incorporating synthetic materials with mineral compositions similar to bone and high osteoconductive properties have lately gained popularity for filling bone defects [1-3].

Calcium phosphate has a unique composition called hydroxyapatite (HA). This arrangement continues with a large number of investigations for applications in bone regeneration. This is because it is extremely stable under physiological settings and closely resembles genuine bone mineral. However, this property leads hydroxyapatite to have limited chemical solubility, resulting in decreased of in vitro absorption [4]. HA has been used as a bone regeneration substance since the 1980s. It exhibits excellent biocompatibility, bioactivity, and osteoconduction qualities. However, it has a deficiency in mechanical qualities. Stress along the Z-axis of HA crystals causes fragilities. To promote bone regeneration, functional ions such as strontium, magnesium, zinc, and carbonate have been added into hydroxyapatite's structure. [5,6,4]

This highlights the significance of utilizing hydroxyapatite with carbonate. Biological apatite has carbonate ions in its natural composition, and these ions are known to perform a significant mechanical and biological role. Carbonated Hydroxyapatite (CAH) may alter and create granules with a variety of well-defined geometries and sizes, adapting to the morphologies of bone defects. However, there have been reports that using CAH has a high rate of problems (>32%), which is owing to the fact that traditional CAH has limited porosity, inhibiting more new bone formation sites and making remodeling difficult. That is why it is critical to obtain a nanometric-sized CAH so that bone neoformation can occur between the granules. CAH has stronger biosorption than hydroxyapatite, which allows for improved bone remodeling while also lowering macrophage inflammatory cytokine release. However, it is unclear if adding CAH improves scaffold immunoregulatory effectiveness without impairing other activities. In addition, the capacity to designate the physicochemical features of calcium carbonate particles has gained popularity since it has the potential to improve drug distribution

in the body, as the geometry of the particles has a significant impact on cellular activity. [7 -11] Thus, because to their widespread availability, low cost, and convenience of use, HA-based bone cements are gaining popularity in surgical applications of bone restoration and regeneration. However, it is also biocompatible, harmless, pH-sensitive, and biodegradable. [11 - 12]

As a result, the goal of this work was to produce nanoparticulate hydroxyapatite replaced by carbonate using aqueous precipitation at low temperatures. Physicochemical characteristics and cytotoxicity were also be assessed. Subsequently, this effort will focus on the development of a carbonated hydroxyapatite cement, which was physically and chemically examined and tested in vitro, with significant implications for possible bone regeneration applications.

Methodology

1. Ethics considerations

This study was carried out in compliance with Brazil's National Health Council Resolution No. 196/1996. This is an in vitro study; hence it does not need to be submitted to the Federal University of Minas Gerais' Research Ethics Committee. The cells will serve as a reference in the cell bank of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

2. Synthesis of Hydroxyapatite

Pure hydroxyapatite was manufactured using the method disclosed by Cox *et al.* in 2014 [13], with modifications. Two solutions were prepared. The first solution (A) contained 0.04 M (4.6012 g) of monobasic ammonium phosphate ((NH₄)H₂PO₄), which was solubilized in 150 ml of deionized water with vigorous magnetic agitation until completely homogenized. The second solution (B) was included 0.067 M (15.7512 g) of calcium nitrate (Ca(NO₃)₂·4H₂O), which was solubilized in 120 ml of deionized water using strong magnetic stirring until completely dissolved.

To adjust the pH to 11, ammonium hydroxide was introduced to solution A drop by drop. The Calcium Nitrate solution was then be placed into a three-mouth reaction flask that has been previously fixed to a condenser and kept in a glycerin bath at 100°C with steady

magnetic stirring. The monobasic ammonium phosphate solution was then be poured into a separating funnel and added drop by drop to solution B.

The mixture was kept in a glycerin bath with constant stirring for 24 hours at 100°C. At the conclusion of the specified period, the precipitate was filtered and rinsed with deionized water until it reaches pH 7. The product from this process was heat treated and dried in an oven at 100°C for 24 hours. Once the designated time has elapsed, the hydroxyapatite was macerated in order to effectively spray the particles. The same process, temperature, pH, and duration was employed to synthesize nanostructured carbonated hydroxyapatite. The solutions of $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 0.05 mol/L and 0.10 mol/L, was added to solution B and then integrated into solution A at a flow rate of 4ml/min.

3. Physicochemical properties of hydroxyapatite particles

3.1 Scanning electron microscopy (SEM)

The morphological examination of the HAC particles was performed using scanning electron microscopy (SEM) on a scanning electron microscope (JEOL model JSM 6360 LV) with an acceleration voltage of 15 kV and a magnification power of 1000x and 15000x. The samples were metallized with 3 nm of gold before analysis.

3.2. X-ray diffraction

The generated HAs' crystallinity was determined by X-ray diffraction. The SHIMADZU apparatus, model XRD-7000 X-RAY (DQ-UFG), was obtained the diffractograms utilizing copper tube and Cu K α radiation ($\lambda=1.54051 \text{ \AA}$) operating at 30 kV and 30 mA. The analyses were performed at angles of 2θ ranging from 4 to 60 degrees and a scanning speed of $4\theta \text{ min}^{-1}$.

3.3 FT-IR

The FT-IR was utilized to determine the functional groups in the PAH, HAC5, and HAC10 samples. The data was recorded using a Perkin Elmer GX spectrophotometer with a 4 cm^{-1} resolution from UFG's Department of Chemistry. The samples, manufactured in KBr tablets, was dried first and then examined in the $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ range. The data was handled by the ACD/SpecManager 6.0 application and ACD/labs.

4. Properties of Bone Cements

4.1 Composition

Hydroxyapatite-based bone cements consist of two phases: powder and liquid. The powder phase was supplemented with 90% HA and 10% anhydrous dibasic calcium phosphate. The liquid was composed of an aqueous solution comprising 2% sodium hydrogen phosphate, 2% calcium chloride dihydrate, 2% beta-glycerophosphate, and 5% hydroxypropyl cellulose.

4.2 Physicochemical Characterization of Bone Cements

The cements' composition and structure were characterized using X-ray diffraction, infrared absorption with Fourier transform, and a wettability test.

4.3 Absorption spectroscopy in the Fourier transform infrared region

The FT-IR was used to investigate the molecular interactions between PAH, HAC5, and HAC10 cements. The infrared absorption spectra were recorded using a Perkin Elmer GX spectrophotometer with a resolution of 4 cm⁻¹ from UFMG's Department of Chemistry. The samples were produced in KBr tablets, dried, and evaluated in the range of 4000 to 400 cm⁻¹. The data were processed using the ACD/SpecManager 6.0 application, ACD/labs.

4.4 Contact angle (wettability)

Wettability is determined by the contact angle, which is the angle formed by the tangent of the liquid-vapor interface and the solid surface at the three-phase contact line. Traditionally, the contact angle is measured from the liquid side. The experiment will be carried out using the SEO Phoenix 300 Touch Contact Angle Measurement System.

4.5 Setting time test

The initial and ultimate setting periods of the cements were measured using Gillmore needles in accordance with the ASTM C266-08 Standard (SIEK *et al.*, 2017). The cement powder and liquid phases were mixed for 120 seconds to ensure homogeneity. The

modified paste was put onto metal discs measuring 10 mm by 3 mm. After 120 seconds, the light needle (113.4g and 2.12 mm) was put on the paste's surface for 5 seconds and repeated every 1 minute. The initial setup time was determined when the needle left no mark on the surface. The ultimate setting time was determined when the heavy needle (453.6g and 1.06mm) was unable to mark the cement surface. The measurements were taken in triplicate.

4.6 pH Measurement

The samples were placed in falcon tubes containing 10 ml of MilliQ® water and maintained at room temperature. The MS TECNOPON, mPA-210, from Brazil, was used for the measurements. Values were taken at 5, 10, 20, 30, 60, and 120 minutes intervals, as well as 1, 2, 3, 4, and 5 days later. MilliQ water is replenished daily. The test was carried out in triplicate.

4.7 Wash Resistance Test

The wash resistance test involved evaluating a basic weight reduction procedure. The paste samples were immersed in 20 milliliters of MilliQ water. After 24 hours, the samples were heated in an oven at 70°C for 1 hour and weighed again. The tests were done three times, and the final result was calculated as a percentage loss of total mass.

5 In vitro biological testing.

The MTT assay was used to investigate the direct cytotoxicity of the cements. Cells from L929 ATCC n° CCL-1 and MC3t3-E1 ATCC n° CRL-2594 were subjected to samples of culture medium (DMEM + SFB) at a concentration of 200 µg/mL in 24-well plates. The samples were measure 6x4mm and was be created in duplicate. The samples were then be disinfected for 1 hour using UV radiation. The specified times were seven and fourteen days.

The indirect cytotoxicity of HA powder was assessed using the MTT assay and its eluate (supernatant). To get the eluates, 2g from each group was weighed and disinfected with UV radiation for 1 hour. The samples were then be put onto plates containing 2 mL of the appropriate culture media for each cell line employed and cultured at 37°C for 24 hours. 200µL of eluate was put onto a 96-well plate at 24, 48, and 72 hours. The tests were conducted in

hexaplicates, and absorbance was measured at 570 nm with a Thermo Scientific Multiskan spectrophotometer (MCC/340 spectrophotometer).

The Alizarin S Red test was used to know the mineralization produced by calcification nodules in the cells. Samples of 2x2x2mm cement were placed in a 24-well plate. The culture medium was replaced every two days. After 7 and 14 days, the cell cultures were washed twice in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes, and rinsed twice with PBS. After the second wash, Alizarin red 0.2% was added to the wells and left for 5 minutes. Following that, extensive washing with PBS was conducted. The plates were taken to the ICB/UFMG, where the wells were inspected and photographed using the Citation 5 instrument.

The hemolysis test was performed to determine the samples' compatibility with blood. For the experiment, falcon tubes were filled with 1ml of rabbit blood and 9ml of PBS. The falcon was centrifuged at 500 g for 10 minutes. The procedure is done three times, and after the final centrifugation, the supernatant is collected and 1ml of PBS is added. Plating was done on a 96-well plate with positive control (100 μ L blood + 100 μ L TritonX), negative control (100 μ L blood + 100 μ L PBS), and eluates of CHAP, CHAC5, and CHAC10 (100 μ L blood + 100 μ L eluate). The test was done in Hexaplicate.

Results

The microscopy results were displayed in Figure 1. Panels A and B show the existence of particles < 50 micrometers, resulting in an uneven surface. This is typical of the HA nanoparticle precipitation production process. The micrographic pictures of PAH and HAC10 (C, D) demonstrate the existence of agglomerated particles \leq 50 micrometers and a heterogeneous and porous surface (Figs 1, B, and D). When examining the micrographs of the cements in the CHAP in the panels (E, F) and the CHAC10 cements (G, H), it is possible to notice the presence of a granular surface; despite the inclusion of particles of pure and carbonated hydroxyapatites in both samples, the surface roughness is more homogeneous due to the presence of polymer from the liquid phase.

The XRD imaging standards for hydroxyapatites and cements (Fig. 2) align with ICCD standards for hydroxyapatite. The diffractogram peaks were more dispersed, indicating low crystallinity. The results indicated diffraction peaks equivalent to those of stoichiometric HA at

values of 2θ : 25.68°, 28.85°, 31.80°, 32.81°, 33.85°, 39.77°, 46.71°, and 49.40°. It was also noticed that when the amount of carbonate ions increased, the strength of the peaks decreased.

The CAH and CHAC spectra contained HA-specific absorption regions. The absorption band characteristic of symmetrical stretching of the OH- group of HA may be seen at around 3560 cm^{-1} . The bands at 870 cm^{-1} and 1460 cm^{-1} are typical of the CO_3^{2-} group. PO_4^{3-} ions are responsible for the bands observed at 1030 cm^{-1} . It was also discovered that samples containing 5% and 10% carbonate had better transmittance than PAHs.

The wettability test for contact angle at a contact period of 1 second, all cements exhibited hydrophilic properties. However, CHAC5 and CHAC10 shown superior hydrophilic potential compared to CHAP. After a duration of 30 seconds, the hydrophilicity of the materials was confirmed through a reduction in angles.

The setting time test measured the ratio of powder to liquid was established at 0.6 for the purpose of handling the cements and conducting the tests. The initial setup time was comparable among all samples, with a small elevation observed in the CHAP sample. In contrast, the CHAC5 and CHAC10 groups exhibited a significant reduction in the final setup time compared to the CHAP group.

The pH levels of all samples decreased within the initial 10-minute period. Following a duration of 20 minutes, the CHAP and CHAC5 groups exhibited a progressive increase in values, whereas the CHAC10 group-maintained stability until the 60-minute mark. Within 24 hours, there was a decline in the values of all groups, with the CHAC5 and CHAC10 groups maintaining a value of 6.6 until day 3. Following a 4-day assessment period, the pH levels rose to 6.9 (CHAP), 7.0 (CHAC5), and 7.1 (CHAC10).

The test for degradation showed no apparent deterioration of the cements by visual inspection. Following the drying process, a little decrease in mass was detected in all experimental groups. The disintegration findings of the CHAC5 and CHAC10 groups were marginally lower than those of CHAP.

In vitro biological tests

Cytotoxicity

Upon examining the findings of the direct MTT assay of the cements, it was observed that the CHAP, CHAC5, and CHAC10 groups exhibited a notable improvement in cell viability. After 14 days, the viability of CHAC10 was 102.05%, whereas the CHAC5 group had a viability of 86.87%. The CHAC10 group had cell viability that remained above 100%. Therefore, the cements exhibited no harmful effects on the MC3T3 and L929 cells when they were cultured together.

Figure 6 shows the results of a direct contact MTT experiment on coculture cells of L929 and MC3T3 in the CHAP, CHAC5, CHAC10, and control groups. The assay was conducted for 7 days (A) and 14 days (B). The indirect cytotoxicity test, assessed using the MTT method, confirmed the results obtained from the direct MTT test, indicating that the groups did not exhibit any cellular cytotoxicity. In the MTT assay conducted using L929 cells, the experimental groups exhibited outcomes that were comparable to those of the control group during a 24-h timeframe. The outcomes of CHAP, CHAC5, and CHAC10 were superior than those of the control group at 48 and 72 h. When exposed to MC3T3 cells, the eluates from the HAC5 group exhibited superior cell viability consistently, but both HAP and HAC10 had comparable outcomes to the control group. Upon examining the findings of MTT in Coculture, it was observed that the outcomes were consistent across all groups. Figure 7 shows the results of the indirect contact MTT assay of PAH, HAC5, and HAC10 on L929 cells, MC3T3 cells, and coculture cells.

Alizarin Red S mineralization test

The calcification nodules had a pinkish-reddish hue in the microscopic images. During the 7-day study, the CHAC5 group exhibited a higher quantity of nodules, which occupied a large area of mineralization as shown in Figure B1. Only two calcification nodules were found in the control group, however a larger quantity was observed in the CHAP, CHAC5, and CHAC10 groups.

Figure 8 shows the Alizarin Red S staining used to detect mineralization. The duration of the chapter is 7 days. (B) CHAC5 has a duration of 7 days. (C) CHAC10 – 7 days. The control group was observed for a period of 7 days. The duration of the CHAP is 14 days. The duration of CHAC5 is 14 days. The duration of CHAC10 is 14 days. The control group was observed for a period of 14 days.

The findings from the 14-day experiment revealed a greater extent of calcification in all groups. Nevertheless, the CHAP, CHAC5, and CHAC10 groups had a more intense hue with 4x magnification in comparison to the control group. Furthermore, the control group had a greater extent of non-calcified region.

The hemolysis test was conducted to evaluate the biocompatibility of the cements by determining their potential to cause damage to blood cells. The positive control (PC) demonstrated total cellular damage, but the negative control (NC) indicated that the PBS effectively inhibited cell lysis. The hemolysis rate for the CHAC 5 group was 8%, while the CHAC 10 group had a hemolysis rate of 10%. The CHAP Group saw a hemolysis rate of 7%.

Discussion

The objective of this study was to create a novel kind of bone cement by incorporating carbonate ions into nano-particulate hydroxyapatite. The purpose was to assess the cellular reaction to this biomaterial.

The incorporation of carbonate ions into the hydroxyapatite composition resulted in enhanced mechanical characteristics of the cement. The distortion of the crystalline grating parameter promotes a change in the morphology of the powder and the thermal behavior, being directly related to the degree of carbonate added in the composition. Furthermore, an increased presence of substituted carbonate ions in hydroxyapatite leads to enhanced dissolution, decreased crystallinity, and diminished particle sizes [14- 17]. The results confirm the prior comments, showing the presence of particle clusters smaller than 2 μm , shorter setting time, improved performance in the wash resistance test, and positive outcomes in the biological tests. The presence of carbonate in the network of biological apatites is responsible for their reduced crystallinity, a fact widely acknowledged. Consequently, the presence of these ions in HA plays a crucial role in the formation of the biomaterial, resulting in the production of nanoscale and potentially shapeless crystals. [18, 19]

The inclusion of HPMC polymer in the cement serves to enhance cohesiveness and increase resistance to washing. This polymer has already been documented in the literature for these specific objectives, and its utilization facilitates more effective control over the mechanical characteristics of cement. The introduction of hydroxypropyl methylcellulose

polymer not only enhances cohesiveness and wash-out resistance, but also improves setting time and mechanical properties. [20, 21, 22]

The formation of uneven surfaces due to the aggregation of PAH and HAC particles is a common feature observed in the precipitation production process of HA nanoparticles. Prior research has demonstrated that the SEM analysis revealed a microscopic image resembling that of the current study, in which the hydroxyapatite (HA) particles were observed in clusters measuring 2 μ m. These clusters formed many chains of nanometric-sized hydroxyapatite. Another study achieved the synthesis of hydroxyapatite (HA) at a temperature of 100°C for a duration of 12 hours. This process resulted in the formation of agglomerates with diverse shapes, sizes, and crystallite structures. Additionally, the HA exhibited a high capacity for agglomeration, leading to the creation of micropores between the particles. These micropores facilitate the penetration of physiological fluids and enhance the adhesion of the biomaterial to the newly formed bone tissue, thereby promoting osseointegration. In another investigation, it was discovered that carbonated hydroxyapatite clusters were observed within microspheres ranging from 425-600 μ m, which is consistent with the findings of our own research. The inclusion of Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) resulted in a more uniform surface of the cement, which enhanced the process of cell deposition and osseointegration. Composites selectively promote the breakdown of their components at varied rates, resulting in the formation of pores that are beneficial for the growth of blood vessels (angiogenesis) and the formation of new bone tissue (osteogenesis). [23, 24, 25]

The observed diffractograms support the findings reported by Li *et al.*, indicating that the peaks of the substituted nHAs are slightly smaller compared to those of PAH. This decrease in crystallinity of the particles can perhaps be attributed to the incorporation of carbonate ions. The peaks of the substituted nHAs exhibit a modest drop, which can be attributed to the inherent properties of the HAP synthesis method and the substitution process. It was evident that as the concentration of carbonate ions increased, there was a gradual decrease in crystallinity. Dias *et al.* (2022) [26] noticed a reduction in crystallinity when Sr, Mg, and Zn ions were added, resulting in a drop in diffractogram peaks. [26, 13, 27] The FT-IR spectrum seen in powders and cements aligns with the bands identified in the investigations conducted by Dias *et al.* in 2023 and Ruiz *et al.* in 2023 [27,28]. These spectra exhibit similarities to those of HA, but with variations in peak intensity and slight shifts in bands. The changes observed in the spectra of powders and cements may be attributed to the increased concentration of carbonate ions inside the network of functional groups. [27-28]

The cements exhibited hydrophilic properties, which facilitated cell attachment by providing a suitable surface. The composites achieve a favorable surface balance by establishing an area that is neither excessively hydrophilic nor excessively hydrophobic. This enhances protein adsorption and promotes the spreading of osteoblasts. During an *in vivo* study conducted on animals, it was observed that the groups using composites for alveolar defect regeneration had more mature and ordered trabeculae compared to those who did not. This led to an improvement in the quality of the newly generated bone. [29]

The inclusion of carbonate ions in the hydroxyapatite-based cements, along with the utilization of the HPMC polymer, resulted in a notable decrease in the ultimate solidification duration. Additionally, the initial setting time duration experienced a modest reduction, with CHAC5 taking 39 minutes and CHAC10 taking 38 minutes. This finding confirms the results reported in the literature, indicating that an increase in carbonate concentration leads to a reduction in the time it takes for the material to solidify. This is attributed to the process of dissolution and precipitation that takes place during the setting time. Optimally, the desired duration for the setting time process should be determined to fall within the range of 15 to 25 minutes. According to the evidence, it was observed that the carbonated hydroxyapatite-based cements had longer setting times than ideal. However, this was likely due to the presence of the HPMC polymer in the liquid phase. On the positive side, the cements showed good resistance to degradation, preventing them from breaking down when exposed to physiological fluids. Typically, the rapid setting time restricts the duration of work, since the cement becomes unsuitable for use prior to the completion of the procedure. A longer setting time can cause a delay in the procedure, as the procedure cannot be completed until the final setting time is reached. [30, 28, 21]

The pH exhibited a slight decline in the initial minutes and remained mostly neutral throughout, which is a crucial property for the biocompatibility of the composite when in touch with cells. The pH levels of the CHAP, CHAC5, and CHAC10 samples consistently stayed above 6.3, with a maximum peak of 7.1. This outcome is more encouraging in contrast to the results reported in the existing literature, which indicate that a pH level above 4.2 is associated with apatite cements. The marginal decline in pH observed during the initial minutes in the CHAC5 and CHAC10 groups could be attributed to the liberation of carbonate and phosphate ions during the process of cement consolidation. The reduction in value can be ascribed to the existence of unreacted carbonate ions, while the alkaline nature of the phosphate ions maintained these values within a pH neutral range. The pH increase observed up to 120 minutes

can be regarded as a beneficial aspect of the samples, potentially associated with enhanced cell adhesion, activity, and homeostasis. [31, 28, 27]

The cell models utilized in the biological tests were selected based on their impact on tissue repair and wound healing processes. The L929 cell line was used to assess its effects on wound healing, while the MC3T3 cells were employed to evaluate their potential for promoting bone cell proliferation. Cell proliferation serves as a reliable indicator of the material's biocompatibility in laboratory settings. [32] Prior research conducted on carbonated hydroxyapatite has demonstrated its exceptional biocompatibility, as well as its capacity to stimulate the growth of fibroblasts and osteoblasts. Although there have been many studies on carbonated hydroxyapatite, only a few have utilized biological tests involving osteoblasts and fibroblasts in coculture. However, it has been demonstrated that coculture can effectively replicate tissue environments, promoting natural regeneration by attracting existing cells and stimulating the self-repair mechanism. The combination of these cells produces a cooperative impact on the development and production of bone, enhancing intercellular communication and facilitating the creation of the extracellular matrix. The extracellular matrix, produced by many cells in tissues and organs, forms a fibrous network composed of glycosaminoglycan and proteoglycan proteins. These proteins are structured in a highly ordered fashion, creating a 3D architecture that establishes a unique local milieu. An experiment utilizing flavonoid-doped nanohydroxyapatite in a cell triculture consisting of osteoblasts, osteoclasts, and endothelial cells demonstrated an enhancement of the bone regeneration microenvironment and improvement in the micro-angiogenesis process, which is crucial for the development of new bone. [26, 33, 34]

The MTT experiment revealed that the carbonated hydroxyapatite-based cement exhibited favorable results in terms of cellular response to the tested chemicals. Conversely, the utilization of calcium phosphate cement doped with high concentrations of strontium and magnesium resulted in a decline in cell viability. A separate study conducted the MTT experiment on MC3T3 cells exposed to silver-doped hydroxyapatite, and observed a decrease in cell viability compared to the results of our investigation. Another study conducted a cytotoxicity test using HAC, and the results supported the findings of the current study, showing a significant improvement in the viability of MC3T3 cells when in contact with the material's scaffolds [35, 36, 37]

Hemolysis refers to the premature breakdown of red blood cells due to damage to the plasma membrane. This damage causes the release of intracellular components, including hemoglobin, which can hinder the healing process and the movement of cells necessary for tissue regeneration. The findings of this study demonstrate that the CHAC5 and CHAC10 groups exhibited comparable results to the CHAP group, indicating the ability of cells to maintain their integrity when in contact with the samples. Furthermore, these results support the notion of compatibility with blood. The research conducted using chitosan and magnesium-doped Hydroxyapatite demonstrated the preservation of the cell membrane integrity of red blood cells, indicating its potential applicability in the human body. [38]

The mineral phase of bone tissue, composed of biological apatite, plays a crucial role in connecting the physicochemical and biochemical processes necessary for the formation of precursor minerals. These precursor minerals are essential for the nucleation of phosphate and calcium ions, as well as for facilitating the formation and accumulation of collagen and hydroxyapatite in bone defects. Upon analyzing the data obtained from the mineralization tests, it was seen that both CHAC5 and CHAC10 demonstrated a significantly shorter mineralization time compared to the control group. A prior study indicated an enhancement in calcium deposition when using hydroxyapatite doped with carbonate and magnesium. The Alizarin Red test demonstrated the significance of calcium phosphate cements, particularly when carbonated hydroxyapatite is present, in promoting mineralization in a laboratory setting. The outcome could be affected by the variability in crystallinity observed in the various forms of calcium phosphate. [27, 39, 40]

The positive outcomes obtained from the analysis of the biomaterial provide a basis for conducting additional *in vitro* biological experiments in this study.

Conclusion

Overall, it was evident that carbonated hydroxyapatite-based cements exhibited encouraging outcomes for bone regeneration, enhancing cell viability and promoting mineralization without inducing hemolysis. The findings collectively establish the essential physicochemical and biological attributes required for the optimal performance of the novel composite, enabling its application in *in vivo* research and the development of materials for tissue engineering.

Acknowledges

The authors thank the Brazilian Agencies: Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for the grants.

1 BHARADWAZ, Angshuman; JAYASURIYA, Ambalangodage C. *Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. Materials Science and Engineering C*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 maio 2020

2 LEE, Jinkyu *et al.* *Current Advances in Immunomodulatory Biomaterials for Bone Regeneration. Advanced Healthcare Materials*. [S.l.]: Wiley-VCH Verlag. , 21 fev. 2019

3 QU, Yu *et al.* Bone cements for therapy and regeneration for minimally invasive treatment of neoplastic bone defects. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 9, n. 21, p. 4355–4364, 7 jun. 2021.

4 SALAM, Nasseem; GIBSON, Iain R. Lithium ion doped carbonated hydroxyapatite compositions: Synthesis, physicochemical characterisation and effect on osteogenic response in vitro. *Biomaterials Advances*, v. 140, 1 set. 2022.

5 WEINER, Steve. *Transient precursor strategy in mineral formation of bone. Bone*. [S.l: s.n.]. , set. 2006

6 HOU, Xiaodong *et al.* Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 13, n. 187, 2022.

7 BIGI, A *et al.* Chemical and Structural Characterization of the Mineral Phase from Cortical and Trabecular Bone. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 68, n. 1, p. 45–51, 1997.

8 TANG, Pei Fu *et al.* Development, characterization, and validation of porous carbonated hydroxyapatite bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, v. 90 B, n. 2, p. 886–893, 2009.

9 IGETA, Kazuki *et al.* Morphological and functional changes in RAW264 macrophage-like cells in response to a hydrated layer of carbonate-substituted hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 105, n. 4, p. 1063–1070, 1 abr. 2017.

10 JIA, Xiaoshi *et al.* The polycaprolactone/silk fibroin/carbonate hydroxyapatite electrospun scaffold promotes bone reconstruction by regulating the polarization of macrophages. *Regenerative Biomaterials*, v. 9, 2022.

11 BAHROM, Hani *et al.* Controllable Synthesis of Calcium Carbonate with Different Geometry: Comprehensive Analysis of Particle Formation, Cellular Uptake, and Biocompatibility. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 7, n. 23, p. 19142–19156, 2 dez. 2019.

12 MANTSOPOULOS, Konstantinos *et al.* Hydroxyapatite bone cement in the reconstruction of defects of the long process of the incus: Personal experience and literature review. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*, v. 42, n. 4, 1 jul. 2021.

13 COX, Sophie C. *et al.* Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. *Materials Science and Engineering C*, v. 35, n. 1, p. 106–114, 2014.

14 COPETE, Hamilton; LÓPEZ, Esperanza; BAUDIN, Carmen. Synthesis and characterization of B-type carbonated hydroxyapatite materials: Effect of carbonate content on mechanical strength and in vitro degradation. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 2024b.

15 LOPES, Bruno S B *et al.* EFFECT OF CALCIUM PHOSPHATE COMPOSITE WITH DOXYCYCLINE AS A GRAFT FOR BONE DEFECT. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 15, n. 6, p. 1000, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.15>>.

16 PEROOS, Sherina; DU, Zhimei; DE LEEUW, Nora Henriette. A computer modelling study of the uptake, structure and distribution of carbonate defects in hydroxy-apatite. *Biomaterials*, v. 27, n. 9, p. 2150–2161, mar. 2006.

17 TAMM, Toomas; PELD, Merike. Computational study of cation substitutions in apatites. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 179, n. 5, p. 1581–1587, maio 2006.

18 BIGI, A *et al.* *Calcified Tissue International The Role of Magnesium on the Structure of Biological Apatites. Calcif Tissue Int.* [S.l: s.n.], 1992.

19 KALITA, Samar J.; BHATT, Himesh A. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering C*, v. 27, n. 4, p. 837–848, 16 maio 2007.

20 BOHNER, Marc. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. *European Cells and Materials*, v. 20, p. 1–12, 2010.

21 HABLEE, Sufiamie *et al.* Calcium phosphate cement for bone filler applications. *Journal of Advanced Research in Materials Science*, v. 39, p. 20–31, 2017a. Disponível em: <www.akademiabaru.com/arms.html>.

22 ZHANG, Jingtao *et al.* *Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties*. *Acta Biomaterialia*. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2014

23 RIGO, Eliana Cristina da Silva; GEHRKE, Sergio Alexandra; CARBONARI, Marcelo. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. *Rev. Dental Press Periodontia Implantol.*, v. 1, n. 3, p. 39–50, jul. 2007.

24 COSTA, A C F M *et al.* Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 4, n. 3, p. 29–38, 2009. Disponível em: <www.dema.ufcg.edu.br/revista>.

25 MOURÃO, Carlos Fernando de Almeida Barros *et al.* Does the association of blood-derived growth factors to nanostructured carbonated hydroxyapatite contributes to the maxillary sinus floor elevation? A randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, v. 23, n. 1, p. 369–379, 29 jan. 2019.

26 LI, Mei *et al.* Osteoblast/fibroblast coculture derived bioactive ECM with unique matrisome profile facilitates bone regeneration. *Bioactive Materials*, v. 5, n. 4, p. 938–948, 1 dez. 2020.

27 DIAS, Alexa Magalhães *et al.* Magnesium (Mg²⁺), Strontium (Sr²⁺), and Zinc (Zn²⁺) Co-substituted Bone Cements Based on Nano-hydroxyapatite/Monetite for Bone Regeneration. *Biological Trace Element Research*, v. 201, n. 6, p. 2963–2981, 1 jun. 2023.

28 RUIZ, Jeisson *et al.* Calcium phosphate cements improved by addition of carbonated Hydroxyapatite type B. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, v. 62, n. 4, p. 315–328, 1 jul. 2023.

29 LOPES, MAFS. *Glass reinforced hydroxyapatite composites*. 1999. 1–189 f. Universidade do Porto, Porto, 1999.

30 QI, Xiaotong *et al.* Development and characterization of an injectable cement of nano calcium-deficient hydroxyapatite/multi(amino acid) copolymer/calcium sulfate hemihydrate for bone repair. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 4441–4452, 21 maio 2013.

31 GINEBRA, Maria Pau *et al.* *Calcium phosphate cements as drug delivery materials. Advanced Drug Delivery Reviews.* [S.l.: s.n.], set. 2012

32 LOZANO, Rosa María *et al.* Response of MC3T3-E1 osteoblasts, L929 fibroblasts, and J774 macrophages to fluoride surface-modified AZ31 magnesium alloy. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 101, n. 10, p. 2753–2762, out. 2013.

33 HUSSEY, George S.; DZIKI, Jenna L.; BADYLAK, Stephen F. *Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. Nature Reviews Materials.* [S.l.]: Nature Publishing Group., 1 jul. 2018

34 FORTE, Lucia *et al.* Antioxidant and bone repair properties of quercetin-functionalized hydroxyapatite: An in vitro osteoblast-osteoclast-endothelial cell co-culture study. *Acta Biomaterialia*, v. 32, p. 298–308, 1 mar. 2016.

35 ARKIN, Vetharaj Hephzibah Rajam *et al.* Characterization and in Vitro Evaluations of Injectable Calcium Phosphate Cement Doped with Magnesium and Strontium. *ACS Omega*, v. 6, n. 4, p. 2477–2486, 2 fev. 2021.

36 SIRAIT, M. *et al.* Characterization of hydroxyapatite by cytotoxicity test and bending test. 18 fev. 2022, [S.l.]: Institute of Physics, 18 fev. 2022.

37 SARI, Mona *et al.* Porous carbonated hydroxyapatite-based paraffin wax nanocomposite scaffold for bone tissue engineering: A physicochemical properties and cell viability assay analysis. *Coatings*, v. 11, n. 10, 1 out. 2021.

38 BHOWMICK, Arundhati *et al.* Organically modified clay supported chitosan/hydroxyapatite-zinc oxide nanocomposites with enhanced mechanical and biological properties for the application in bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, p. 11–19, 1 jan. 2018.

39 GUARINO, Vincenzo *et al.* MgCHA particles dispersion in porous PCL scaffolds: In vitro mineralization and in vivo bone formation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 8, n. 4, p. 291–303, 2014.

40 CELOTTI, Giancarlo *et al.* Crystallinity in apatites: How can a truly disordered fraction be distinguished from nanosize crystalline domains? nov. 2006, [S.l.: s.n.], nov. 2006. p. 1079–1087.

ANEXO C – Artigo publicado durante o Mestrado

Lopes et al., *IJPSR*, 2024; Vol. 15(6): 1000-09.

E-ISSN: 0975-8232; P-ISSN: 2320-5148

IJPSR (2024), Volume 15, Issue 6

(Research Article)

INTERNATIONAL JOURNAL
OF
PHARMACEUTICAL SCIENCES
AND
RESEARCH

Received on 29 November 2023; received in revised form, 05 March 2024; accepted, 05 April 2024; published 01 June 2024

EFFECT OF CALCIUM PHOSPHATE COMPOSITE WITH DOXYCYCLINE AS A GRAFT FOR BONE DEFECTBruno S. B. Lopes ¹, Larissa C. R. de Souza ², Richard A. Fills-Cerchar ¹, Guilherme L. Camposy ¹, Soraia Macari ¹, Leonardo A. Lanza ¹, Alfonso Gala-Garcia ^{1,3}, Carlos A. Tagliati ² and Maria E. Cortés ¹Department of Restorative Dentistry ¹, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.Department of Clinical and Toxicological Analysis ², Faculty of Pharmacy, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.Faculty of Dentistry and Health ³, Universidade Federal da Bahia, Brazil.**Keywords:**

Bone regeneration, Bioceramics, Biodegradable polymers, Composite and doxycycline

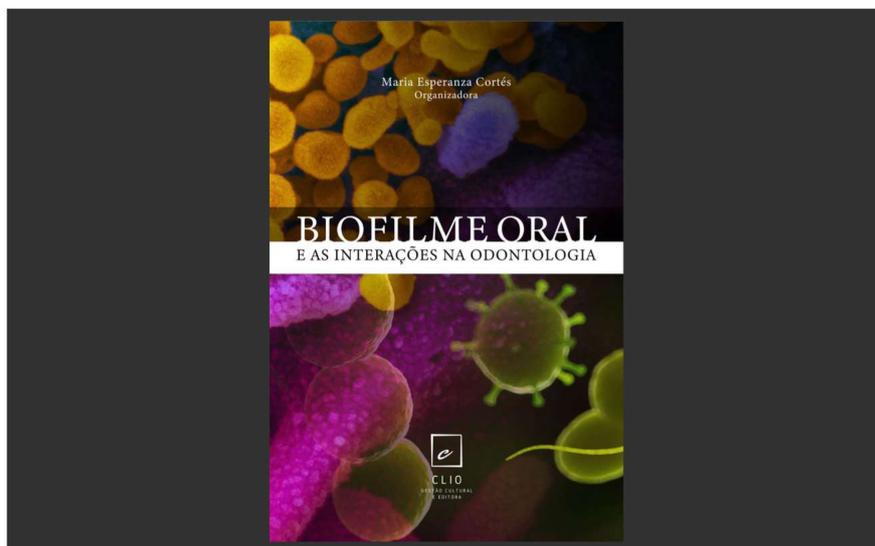
Correspondence to Author:

Maria Esperanza Cortés Segura

Professor,
Department of Restorative Dentistry,
Faculty of Dentistry, Universidade
Federal de Minas Gerais, Belo
Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail: mecortes@ufmg.br

ABSTRACT: The objective was to determine the effect of calcium phosphate composite with doxycycline molecularly included as a graft on bone defect after tooth extraction for slow delivery of drug. **Methods:** animal were distributed into four groups: Group 1 (Blood Clot), Group 2 (TCP), Group 3 (TCP/PCL/PLGA), and Group 4 (TCP/PCL/PLGA/DOX/CD). An alveolar bone defect was created, and the analysis was conducted at preset intervals of T1 (14 days) and T2 (28 days). **Results:** The results of the histological study using H&E staining demonstrated the existence of newly created bone in all experimental groups. Group 4 exhibited the biggest area of newly formed bone at T1, and this observation was consistent across all time points examined. Group 4 exhibited a consistent volume across the measured time intervals, as evidenced by the existence of more advanced and structured trabeculated bone in T2 in comparison to T1. Even more Group 4, notably T2, displayed the highest proportion (47%) of newly formed bone area in comparison to Group 1 (36%), Group 2 (33%), and Group 3 (31%). The statistical analysis indicated that there were not statistically significant differences at recorded times both within the same groups and between the different groups ($p > 0.05$). The number of osteoclasts observed in Group 4 of T2 exhibited a reduction compared to Group 4 of T1, suggesting that DOX has an inhibitory effect on the formation of osteoclasts. Therefore, the doxycycline/CD combination promotes the production of new bone during the crucial early phases of bone repair (T1).**INTRODUCTION:** After an exodontia procedure, the alveolar repair process involves the formation of bone tissue that remodels and regenerates the defect region ¹. This process of bone repair may be influenced, sped up, or slowed down by vascular supply, local microbial conditions, and systemic factors.In this context, the proliferation and differentiation of bone cells directly involved in the repair process ² play an important role, with osteoblasts responsible for bone matrix deposition and osteoclasts for its resorption ³.Biomaterials with different compositions and uses have been talked about a lot in terms of how to improve the process of alveolar bone regeneration after extractions. In terms of the tensile strength and modulus of elasticity of the neofomed tissue, the osteoconductive properties of bioceramics and polymers forming biocomposites and hybrid materials are generally satisfactory for use in bone reconstructions ⁴.**QUICK RESPONSE CODE**DOI:
10.13040/IJPSR.0975-8232.15(6).1000-09This article can be accessed online on
www.ijpsr.comDOI link: [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.15\(6\).1000-09](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.15(6).1000-09)

ANEXO D – Capítulo de livro publicado

BIOFILME ORAL E COVID-19

Guilherme Luz Campos

Paula Juliene Teles Alves

Amália Moreno

Resumo

Em meados de 2019, um novo vírus SARS-Cov-2 foi detectado em Wuhan, na China, e se espalhou por todo o mundo rapidamente causando uma pandemia, e a doença proveniente dessa infecção foi denominada COVID-19. Pacientes que apresentavam comorbidades manifestavam sintomas mais severos da doença. O biofilme também deve ser considerada um fator de risco para o curso mais severo da doença. Essa hipótese é baseada nos dados de pesquisas recentes, as quais apontam para uma associação entre baixa saúde oral e severidade da COVID-19 via mecanismos direto e indireto. O mecanismo direto está conectado com os receptores de Enzima conversora de angiotensina II (ACE-2), enquanto o método indireto está voltado para a cascata inflamatória e superinfecções bacterianas. Infecções secundárias bacterianas e fúngicas em relação ao COVID-19 são amplamente retratadas e devem receber uma atenção especial. Pacientes com sintomas graves de COVID-19 tratados em UTI (Unidade de Tratamento Intensivo) e CTI (Centro de Terapia Intensiva) são dez vezes mais propensos a desenvolver infecção bacteriana/fúngica secundária, do que uma infecção secundária viral. E para esses pacientes, a saúde oral ruim é um grande problema. A inserção do tubo endotraqueal gera uma alteração da flora oral, e conseqüentemente altera a composição do microbioma oral sendo essencial a conscientização da importância do controle adequado do biofilme dental nos indivíduos com Covid-19.

Palavras-chave: COVID-19; Controle do biofilme; Placa bacteriana.