



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO-SENSU* EM ODONTOLOGIA

PIO MOERBECK DA COSTA FILHO

**AVALIAÇÃO NORMATIZADA DA BIOCAMPATIBILIDADE DE
MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA
COM CINCO METAIS (Sr, Mg, Mn, Zn e Fe): ESTUDO
EXPERIMENTAL EM SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Salvador - Bahia
2020

PIO MOERBECK DA COSTA FILHO

**AVALIAÇÃO NORMATIZADA DA BIOCAMPATIBILIDADE DE
MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA
COM CINCO METAIS (Sr, Mg, Mn, Zn e Fe): ESTUDO EXPERIMENTAL EM
SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para o título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração em Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Andrade Barreto

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mônica Calasans Maia

Salvador – Bahia
2020

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

C837 Costa Filho, Pio Moerbeck da
Avaliação normatizada da biocompatibilidade de microesfera de hidroxiapatita nanoestruturada com cinco metais (Sr, Mg, Mn, Zn e Fe) : estudo experimental em subcutâneo de camundongos. / Pio Moerbeck da Costa Filho. – 2020.
63f.: 30cm.

Orientador: Prof^o. Dr. Maurício Andrade Barreto
Coorientadora: Prof^a. Dra. Mônica Calasans Maia

Mestre em Odontologia
Inclui bibliografia

1. Biocompatibilidade. 2. Hidroxiapatita Carbonatada. 3. Nanotecnologia. 4. Camundongos. I. Barreto, Maurício Andrade. II. Avaliação normatizada da biocompatibilidade de microesfera de hidroxiapatita nanoestruturada com cinco metais (Sr, Mg, Mn, Zn e Fe) : estudo experimental em subcutâneo de camundongos.

CDU: 616-089.843


PIO MOERBECK DA COSTA FILHO

**“AVALIAÇÃO NORMATIZADA DA HIDROXIAPATITA CARBONATADA
NANOESTRUTURADA COM CINCO METAIS (SR, ZN, FE, MG, MN): ESTUDO
EXPERIMENTAL EM SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS”**

Dissertação apresentada à Escola
Bahiana de Medicina e Saúde
Pública, como requisito parcial para
a obtenção do Título de Mestre em
Odontologia.

Salvador, 11 de abril de 2019.

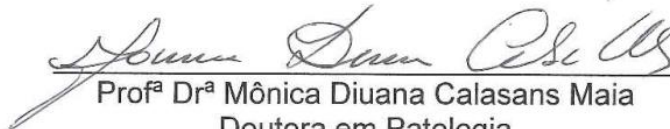
BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado
Doutora em Patologia Humana
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMS



Prof^ª. Dr^ª. Isabela Cerqueira Barreto
Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Universidade Federal da Bahia – UFBA



Prof^ª Dr^ª Mônica Diuana Calasans Maia
Doutora em Patologia
Universidade Federal Fluminense, UFF

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Manuscrito 1

Figura 1 - Evolução da funcionalidade e da capacidade regenerativa dos biomateriais ao longo do tempo	17
Figura 2 - Exemplo de morfologia dos substitutos ósseos, de acordo com a necessidade clínica do profissional	19
Figura 3 - Organograma demonstrando o ciclo para o desenvolvimento de Biomateriais.....	19
Figura 4 - Demonstrando as aplicações da Hidroxiapatita, havendo também correlação entre substitutos ósseos e fármacos, componentes e revestimento de implantes.....	22
Figura 5 - Organograma adaptado dos diferentes métodos de síntese de hidroxiapatita.....	25
Figura 6 - Desenho esquemático de dissolução parcial/precipitação de apatitas biológicas in vivo e substituições iônicas no cristal de HA Onde é demonstrado que as substituições catiônicas, acontecem no grupamento Ca(II) e as substituições iônicas no grupo hidroxila (OH).....	28

Manuscrito 2

Figura 1 - Difração de Raio-X.....	50
Figura 2 - Espectroscopia vibracional no infra-vermelho com transformada de Fourier	51
Figura 3 - Fotomicrografias representativas da região de implantação dos grupos SHAM (A e B), CHA (C e D) e CHAMetals (E e F) 1 semana após o implante.	52
Figura 4 - Fotomicrografias representativas da região de implantação dos grupos SHAM (A e B), CHA (C e D) e CHAMetals (E e F) três semanas após o implante. ...	53
Figura 5 - Fotomicrografias representativas da região de implantação dos grupos SHAM (A e B), CHA (C e D) e CHAMetals (E e F) 9 semanas após o implante.	54
Figura 6 - Resposta das células inflamatórias (6A-F) e reação geral do tecido (6G-I).	56
Figura 7 - Escore de reação inflamatória de acordo com a ISO 10993-6: 2016.....	57

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1

Tabela 1 - Composição química e parâmetros de rede do componente mineral do osso, esmalte e dentina em comparação com HA estequiométrica23

Manuscrito 2

Tabela 1 - Valores em mols para Calcio (Ca), Fósforo (P), a razão cálcio/fósforo e o percental dos metais na composição do biomaterial51

SUMÁRIO

	MANUSCRITO 01	7
	PRINCÍPIOS BIOLÓGICOS DA HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA ASSOCIADO A METAIS: Revisão de Literatura	8
	RESUMO	9
	ABSTRACT	10
1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	O Tecido Ósseo	13
2.2	Princípios Biológicos do Tecido Ósseo	14
2.3	Cicatrização Óssea e Fatores de Sucesso de um Biomaterial	15
2.4	Características dos Materiais de Enxertia	15
2.5	Evolução dos Biomateriais	16
2.5.1	Biocompatibilidade	18
2.5.2	Biodegradabilidade	18
2.5.3	Propriedades Mecânicas	18
2.5.4	Arquitetura	18
2.6	Nanobiomateriais	20
2.7	A Bioapatita e a Hidroxiapatita	21
3	SUBSTITUTOS ÓSSEOS COM METAIS	27
3.1	Magnésio	29
3.2	Zinco	29
3.3	Estrôncio	30
3.4	Manganês	30
3.5	Ferro	30
4	PESPECTIVAS FUTURAS	32
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34
	MANUSCRITO 02	39
	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA BIOCAMPATIBILIDADE DE MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA CARBONATADA COM SUBSTITUIÇÕES CATIÔNICAS	40
	RESUMO	41
	ABSTRACT	42
1	INTRODUÇÃO	43
2	MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1	Síntese dos biomateriais	45
2.1.1	Confecção das esferas	45
2.2	Caracterização dos biomateriais	46
2.2.1	Difração de Raio-X (DRX)	46
2.2.2	Espectroscopia vibracional no infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR)	46
2.2.3	Espectroscopia por Absorção atômica	47
2.2.4	Análise <i>in vivo</i>	47

2.3	Caracterização dos animais	47
2.4	Procedimentos de anestesia e cirurgia	47
2.5	Obtenção das amostras	48
2.6	Processamento das amostras	48
2.7	Análise histológica descritiva	49
2.8	Análise dos resultados segundo normatização ISO 10993-6:2016	49
3	RESULTADOS	50
3.1	Difração de Raio-X	50
3.2	Espectroscopia vibracional no infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR)	50
3.3	Espectroscopia por Absorção atômica	51
3.4	Análise histológica descritiva	52
3.5	Grau de irritação dos biomateriais de acordo com a normatização da ISO 10993-6:2016	55
4	DISCUSSÃO	58
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICES	70

MANUSCRITO 01

PRINCÍPIOS BIOLÓGICOS DA HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA
ASSOCIADO A METAIS: Revisão de Literatura

Pio Moerbeck da Costa Filho¹, Maurício Andrade Barreto², Mônica Calasans Maia³
Debora Sophia Vale⁴

¹ Mestrando em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/
Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, Salvador, Bahia, Brasil.

² Professor Adjunto do curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e
Saúde Pública/ Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, Salvador,
Bahia, Brasil.

³ Professora Titular do curso de Odontologia da Universidade Federal Fluminense,
Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

⁴Aluna da graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde
Pública/ Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, Salvador, Bahia,
Brasil.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho é apresentar, à luz da literatura, uma ampla revisão, através de revisão da literatura relacionada à enxertos ósseos, biomateriais (BM) e nanotecnologia contendo cinco metais (Zn, Fe, Sr, Mg e Mn), na perspectiva de subsidiar uma pesquisa experimental inédita de avaliação da biocompatibilidade desses material em implante humano. O mercado de BM para enxerto indica uma tendência do uso de materiais sintéticos, em detrimento daqueles de origem biológica, pela facilidade de sua produção em larga escala, reprodutibilidade, dopagem de sua estrutura e controle das suas características físico-químicas e morfológicas, possibilitando a associação com fatores de crescimento. A compreensão da estrutura óssea e sua interação com o corpo humano são fatores de fundamentação para o desenvolvimento de novas pesquisas. Neste contexto, a hidroxiapatita pura (principal componente do osso) carece de propriedades biológicas adequadas, visto que apresenta grande solubilidade e tempo de incorporação rápido, enquanto os materiais que se encontram no mercado apresentam apenas propriedades osteocondutivas, ou seja, ainda desconhece-se algum com propriedade ideal. Foi realizado um levantamento bibliográfico com os descritor substitutos ósseos, biocompatibilidade e os metais envolvidos (Mg, Sr, Zn, Fe, Mn) nas bases de dados Bireme, MedLine e Lilacs, onde foram e selecionados inicialmente 135 periódicos sobre o tema. Após nova triagem, restaram 69 que fazem parte dessa revisão. A posse desse levantamento permitiu aprofundar conhecimentos sobre a temática, ampliar o leque de possibilidades de estudos, assim como permitiu a discussão dos resultados, que corresponde a outro manuscrito (2) integrante dessa dissertação. O consenso internacional aponta a hidroxiapatita como um material de base para biomateriais de enxerto ósseo em humanos, entretanto, isoladamente, possui incorporação rápida, necessitando dopar com uma ou mais estruturas, para alcançar resultados satisfatórios. A Bicompatibilidade, biodegradabilidade e osteocondutibilidade, são características básicas dos BM, assim, com base nesses princípios, as pesquisas translacionais na área de implantes tem evoluído, na busca de mudanças em nível molecular trazendo novos atributos aos BM e, conseqüentemente, resultados favoráveis que permitam a aplicabilidade clínica mais ampla e eficiente (custo/benefício).

Palavras-chave: Regeneração óssea. Substitutos ósseos. Biocompatibilidade. Nanotecnologia.

ABSTRACT

The objective of the present work is to present, in the light of the literature, a broad review, through a review of the literature related to bone grafts, biomaterials (BM) and nanotechnology with metals (Zn, Fe, Sr, Mg and Mn). The BM market for grafting indicates a tendency of the use of synthetic materials, to the detriment of those of biological origin, for the ease of its large-scale production, reproducibility, doping of its structure and control of its physical-chemical and morphological characteristics, association with growth factors. The understanding of bone structure and its interaction with the human body are grounds for the development of new research. In this context, pure hydroxyapatite (main component of bone) lacks adequate biological properties, since it presents great solubility and fast incorporation time, while the materials that are on the market have only osteoconductive properties, ie still not known any with ideal property. Was performed with a bibliographic levantamento bone substitutos descriptor, biocompatibility and metals involved (Mg, Sr, Zn, Fe, Mn) in Bireme databases, Medline, and lilacs, which were initially selected and journals 135 on the subject. After further screening, they remained 69 that are part of this review. The international consensus pointing hidroxiapatita as a base material for bone grafting biomaterials in humans, however, alone, possesses rapid incorporation requiring doped with one or more structures to achieve satisfactory results. The Bicompatibilidade, biodegradability and osteocondutibilidade are basic characteristics of BM as well, based on these principles, translational research in the implant area has evolved, seeking changes at the molecular level bringing new attributes to BM and consequently.

Keywords: Bone Regeneration. Bone Substitutes. Biocompatibility. Nanotechnology.

1 INTRODUÇÃO

O reparo e a reconstrução óssea remontam os primórdios das civilizações antigas. Achados arqueológicos do período pré-inca (3.000 anos a.C.) já mostram a utilização desses materiais. Com o avanço técnico, científico e industrial, a busca por reconstruir perdas ósseas, causadas por neoplasias, traumas, doença periodontal está cada vez mais presente na rotina do profissional de saúde. Com a procura maior de pacientes por reabilitações, e paralelamente, a busca por tratamentos com menor morbidade, os biomateriais estão trazendo para a ciência novas possibilidades, principalmente na Odontologia e Ortopedia^(1,2).

Após a extração dentária, o alvéolo passa por diversas alterações tridimensionais, forma-se um coágulo que lentamente se converte em uma matriz de tecido conjuntivo, em poucos dias. O osso fasciculado, que reveste o alvéolo da extração, sofre reabsorção e perda da sua estrutura original, o que permite que os vasos sanguíneos do espaço medular circundante invadam a matriz provisória. Com a remodelação, o alvéolo se corticaliza com o osso adjacente, tornando-se um só e no seu centro, assim, o osso é remodelado para formar o osso trabecular⁽³⁾. Na área residual óssea, o reparo é finalizado com a formação de tecido fibroso.

Os biomateriais também conhecidos como xenógenos ou heterógenos, são enxertos obtidos de outra espécie, que são quimicamente tratados, eliminando qualquer traço de material orgânico, porém conservando a parte mineral, que é semelhante a matriz óssea humana. Sendo definido de acordo com *Clemson Advisory Board for biomaterials*, um biomaterial é sistematicamente uma substância inerte para incorporação dentro de um tecido vivo (6^o Annual International Biomaterials 1974). A hidroxiapatita(HA) é a base desses materiais osteocondutores, que possuem cerca de 60% de porosidade por unidade de volume, facilitando a migração de osteoblastos e também uma melhor vascularização⁽⁴⁾.

Pesquisadores da área da bioengenharia tecidual óssea estão buscando desenvolver novos biomateriais capazes de atuar como arcabouços para possibilitar a migração celular, a angiogênese, a deposição de nova matriz extracelular, a

mineralização e a regeneração deste tecido de maneira mais próxima com a progressa.

Estes materiais podem ser produzidos a partir de substratos metálicos; poliméricos, naturais ou sintéticos; cerâmicos; ou compósitos. Estes últimos apresentam propriedades físico-químicas que os componentes isolados não apresentariam individualmente e têm atraído a atenção de muitos pesquisadores, pelas possibilidades de combinar as vantagens de diferentes materiais⁽²⁾.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Tecido Ósseo

Os componentes do tecido estão divididos em níveis estruturais tais como; microestrutura que compreendem os (Canais de Volkman, ósteons, sistema havesiano, trabéculas individuais, sistemas intermediários, sistemas circunferenciais interno e externo). A macroestrutura engloba (o osso cortical e o esponjoso), a sub-microestrutura abrange (lamelas); e nanoestrutura inclui o colágeno fibrilar com fase mineral e a sub-nanoestrutura incluindo a (estrutura molecular dos elementos constituintes com colágeno, proteínas não-colágenas e o mineral^(4,5)).

O osso corticalizado possui poucos vasos sanguíneos, e que corresponde a 85% da constiuição basal óssea, um terço do volume do esqueleto, possuindo baixa relação superfície/volume e baixa porosidade, remodelando-se cerca de 2-3% ao ano. Já o tecido esponjoso ósseo, corresponde a cerca de 15% da massa óssea e a dois terços do volume total. As trabéculas ósseas apresentam-se mais dispersas o que favorece a maior circulação de vasos sanguíneos, portando maior atividade metabólica, remodelando-se aproximadamente 24% ao ano⁽⁶⁾.

As células que compõem o tecido são: osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. A MEC apresenta 65% de composição inorgânica, em especial a hidroxiapatita, com a presença de íons, como: CO_3^{2-} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , F^- entre outros⁽⁷⁾.

A MEC é uma fusão complexa de proteínas funcionais, estruturais e proteoglicanas, organizadas em uma estrutura individual e própria, atuando no fornecimento de resistência e suporte à tração, sítios de adesão para receptores celulares, como também, depósitos de sinalização que regularizam processos, tais como: proliferação e orientação celular, reparo tecidual e angiogênese⁽⁸⁾.

O tecido ósseo apresenta apenas duas variedades, em nível macro e microcópico: o tecido ósseo cortical (denso/compacto) e o medular a(trabecular/esponjoso), onde, como a nomenclatura indica, sua diferença reside no agregamento de suas

trabéculas ósseas e invaginação dos vasos sanguíneos, sendo o tecido cortical com menor vascularização e maior rigidez, e o tecido medular ao contrário⁽⁹⁾.

2.2 Princípios Biológicos do Tecido Ósseo

O sucesso dos enxertos depende de uma série de eventos celulares, bioquímicos e biomecânicos. A osteocondução é a propriedade de criar um arcabouço adequado para migração e distribuição das células envolvidas na vascularização e cicatrização óssea, as quais necessitam de conformidade estrutural e superfície de contato com o enxerto. O processo varia de acordo com a estrutura tridimensional do enxerto, propriedades químicas, porosidade e taxa de degradação⁽¹⁰⁾.

A osteoindução é a migração de células osteogênicas e fatores de crescimento do tecido ósseo transplantado, que infiltram no enxerto e induzem as células pluripotentes a se multiplicarem e se diferenciarem em células que compõem o sítio regenerador (diferenciação e proliferação)^(10,11).

Osteogênese, no contexto de enxertia, é a propriedade de formação óssea a partir de células transplantadas do tecido ósseo doador. Estas células, são preservadas por difusão dos tecidos circundantes do leito hospedeiro, até que ocorra a revascularização⁽¹¹⁾. Seguramente o sucesso de incorporação do enxerto ósseo vai requerer a combinação destas propriedades. Estes processos são de extrema importância, contudo, outros fatores fisiológicos também irão influenciar, como a textura de superfície do enxerto, idade e saúde do leito receptor⁽¹²⁾.

O remodelamento é a atividade de deposição e reabsorção da porção inicial, desencadeada de maneira contínua. Sendo assim, uma modificação e/ou reestruturação óssea já existente em um fenômeno combinado que possibilita a renovação do osso já formado⁽¹¹⁾.

O ciclo de remodelamento é chamado de sigma e tem a duração de 17 semanas, envolvendo as seguintes fases: repouso – mecanismo de síntese e reabsorção quase ausentes (120 a 180 $\mu\text{m}/\text{dia}$); ativação – período de reabsorção osteoclástica com formação de um cone cortante de (30 $\mu\text{m}/\text{dia}$); quiescência – período de grande

atividade osteocítica para manutenção e troca iônica – 1 e 2 semanas; formação – intensa atividade osteoblástica – 13 semanas⁽¹³⁾.

Inúmeros fatores são responsáveis pela formação e manutenção óssea, tais como: genética, atividade física, dieta e sistema hormonal⁽⁷⁾.

O envelhecimento está associado com a diminuição da formação óssea. A perda óssea se inicia gradativamente a partir da quarta década de vida, e sendo agravada em mulheres pela menopausa, por um desequilíbrio da reabsorção óssea em relação à formação (biosíntese)⁽¹⁴⁾.

2.3 Cicatrização Óssea e Fatores de Sucesso de um Biomaterial

A regeneração celular consiste na reconstituição pelas próprias células, permitindo a recuperação da sua capacidade funcional. Já a reparação simples ou cicatricial, constitui na reposição das estruturas destruídas, sem possibilidade de restauração⁽¹⁵⁾.

O modelo de reparo ósseo é geralmente ilustrado em ossos longos, ocorrendo em cinco estágios: extravasamento sanguíneo, formação de coágulo e hematoma; proliferação subperiosteal e endosteal, formação do calo ósseo, consolidação e remodelação^(16,17).

O tecido ósseo apresenta grande potencial regenerativo espontâneo, sendo estimulado por forças mecânicas, porém, apresenta limitações em defeitos críticos. Estes defeitos e em situações de falta de homeostasia, há grande possibilidade de danos estéticos-funcionais que podem limitar a qualidade de vida do indivíduo^(16,17).

2.4 Características dos Materiais de Enxertia

Os materiais de enxertia são classificados de acordo com sua origem, e podem ser autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos. Os autógenos são considerados padrão ouro em enxertia, visto que representa o único enxerto que possui as três características de osteocondução, osteoindução e osteogênese e 100% de

biocompatibilidade, visto que é feito o auto-transplante. Como principal aspecto negativo, existe a necessidade de um sítio doador com dimensões compatíveis⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

O enxerto alógeno, originário de banco de ossos, que passa por tratamentos separados ou em conjunto com antibióticos, liofilização e desmineralização, possui traços osteocondutivos e osteoindutivos, sendo bastante insegura a sua utilização com risco de viés na sua aplicabilidade^(17,18).

Os enxertos xenógenos, de origem animal, encontrado em abundância na natureza, possuem capacidade osteocondutiva e servem de arcabouço para neoformação óssea⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

Os aloplásticos, possuem as mesmas características xenógenas, porém, de origem sintética laboratorial, e com uma grande variedade na sua apresentação. A tabela 01 apresenta de maneira sucinta os enxertos e suas principais características^(17,18).

2.5 Evolução dos Biomateriais

Há milhares de anos, a humanidade vem desenvolvendo materiais para substituir parte de seu sistema biológico lesado ou perdido. Inicialmente foram utilizados materiais bionertes, cujo o objetivo era não causar resposta do tipo corpo estranho ao leito que irá receber o material, tendo sua conformidade restabelecida em partes ou em sua totalidade. O biomimetismo fundamenta-se na “área da ciência que tem por fundamento o estudo das estruturas biológicas e suas funções, procurando aprender com a natureza e utilizar esses conhecimentos em diferentes domínios da ciência”⁽¹⁹⁾. A sua evolução é de origem conceitual e não cronológica com a primeira geração, marcada pelo empirismo, onde não havia preocupação estética, e sim funcional, sendo a maioria desses materiais de origem natural, chamada de materiais bionertes, com origem na pré-história até 1961⁽¹⁹⁾.

Os materiais bioinertes não apresentam nenhuma ligação química com os tecidos, como a zircônia e a alumina, se mantendo estável e sem integração com o meio⁽¹⁹⁾. Representam a segunda geração, a partir de 1970, os materiais bioativos, cuja a filosofia era, tendo como foco a biocompatibilidade e biodegradabilidade. Foram

desenvolvidos a partir de materiais comuns, estruturais, porém, com um maior conhecimento de engenharia, medicina e ciência dos materiais aplicados, os quais estimulam uma resposta biológica específica, resultando em uma ligação com o tecido residual, como vidros bioativos, hidroxiapatita sintética e animal e compósitos bioativos⁽¹⁹⁾.

Os materiais bioreativos estão situados entre os bioativos e bioinertes e são largamente utilizados na implantodontia e também na ortopedia, tais como: titânio, nióbio, tântalo⁽²⁰⁾.

Na 3ª e atual geração, os materiais são capazes de estimular a resposta a nível molecular, caracterizada especificamente, de acordo com a sua aplicação^(18,20).

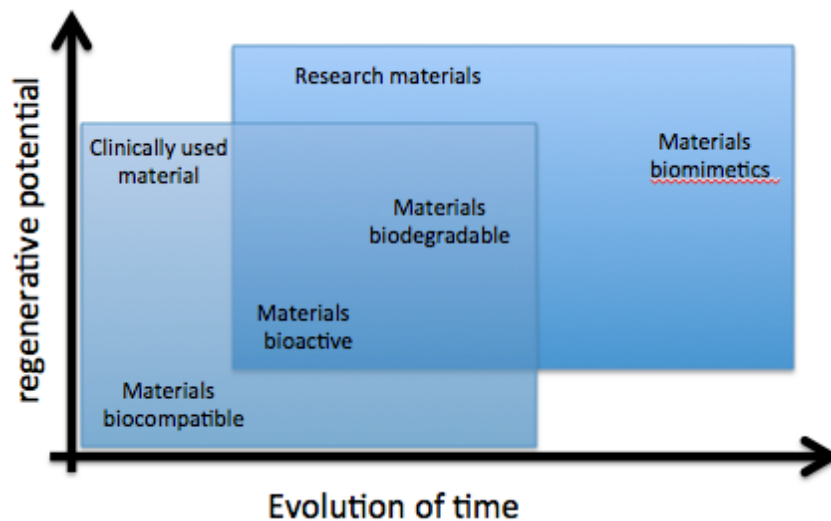


Figura 1 - Evolução da funcionalidade e da capacidade regenerativa dos biomateriais ao longo do tempo

Fonte: Adaptado de HOLZAPFEL et al. (2013).

Algumas características mínimas são indispensáveis para um biomaterial se tornar possível de implantação: biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas e arquitetura tridimensional adequada.

2.5.1 Biocompatibilidade

O principal critério de qualquer substituto ósseo é que ele seja biocompatível, suas células devem aderir e migrar para a superfície até estabelecer-se uma nova matriz na região. Após a implantação deve desencadear uma resposta imune não exarcebada, que não provoque inflamação local, para acontecer resposta de rejeição⁽²²⁾.

2.5.2 Biodegradabilidade

Deve ser capaz de estimular as células a produzir sua própria matriz extracelular. Os subprodutos não devem ser tóxicos, de modo que a degradação aconteça em conjunto com a formação de tecido e, gradativamente, seja substituído por uma nova matriz óssea inter-posicionada na região, o mais próximo com a progressiva⁽²²⁾.

2.5.3 Propriedades Mecânicas

Idealmente, o material deve manter a morfologia em que é implantado, sendo suficientemente resistente para permitir a manipulação cirúrgica durante a sua implantação e uma adaptação ao leito receptor, assim como para que a remodelação óssea seja gradativa⁽²³⁾.

2.5.4 Arquitetura

Atualmente, existem diversas conformidades estruturas de apresentação tais como: pasta, gel, pó, membrana, disco, bloco, grânulo, microesfera, dentre outras – para atender a necessidade clínica do profissional. Esses materiais possuem composição química aprimorada, e características físicas de superfície para favorecer a regeneração⁽²³⁾.

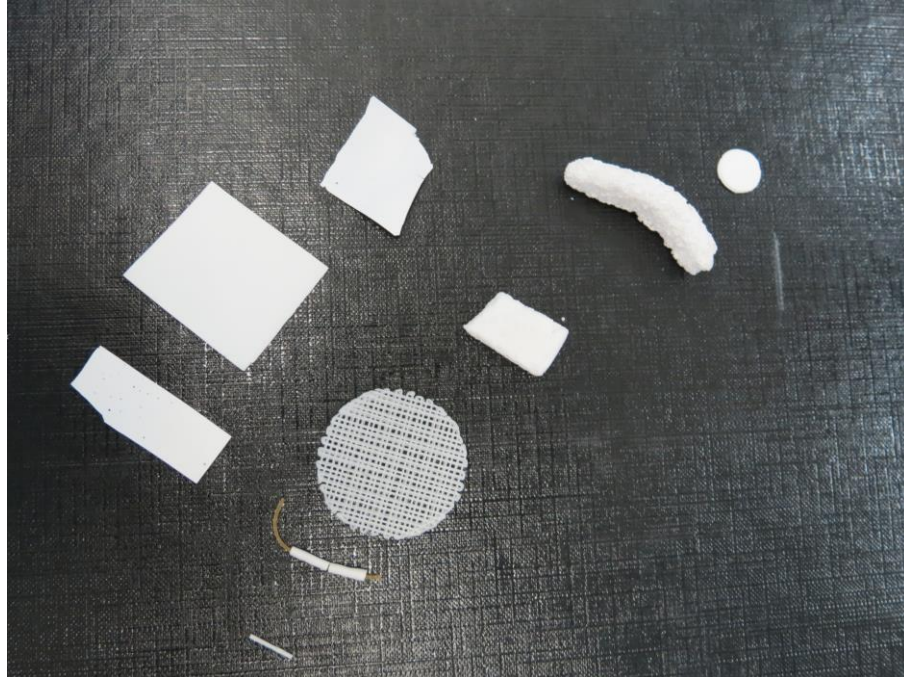


Figura 2 - Exemplo de morfologia dos substitutos ósseos, de acordo com a necessidade clínica do profissional

Fonte: Fotografado no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas/RJ)

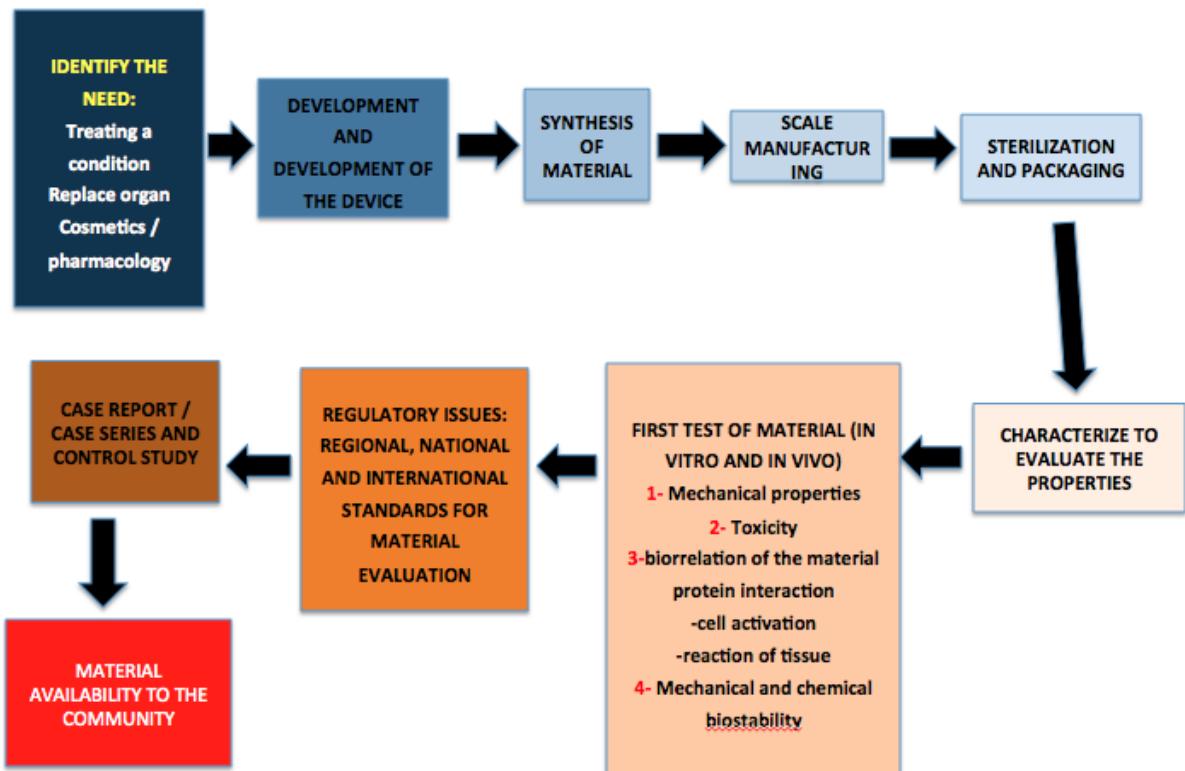


Figura 3 - Organograma demonstrando o ciclo para o desenvolvimento de Biomateriais

Fonte: adaptado de Ratner, B.D. (2013)⁽⁵¹⁾

2.6 Nanobiomateriais

A terminologia nanotecnologia foi utilizada pela primeira vez por Nrio Taniguchi (1974), em uma publicação científica.

O desenvolvimento de materiais nanoestruturados ou com alterações biomiméticas, vem sendo tema relevante em pesquisa fundamental e tecnológica, visto as infinitas possibilidades de novas associações ou compósitos e melhorias em diversas propriedades.

O osso, naturalmente, é nanoestruturado e os materiais com estrutura nanométrica, ou seja, com dimensões inferiores a 100nm, vem ganhando destaque na bioengenharia.

Uma das vantagens da nanoestruturação, é poder mimetizar as propriedades do sítio tratado, através de alterações em suas conformidade mecânica, elétrica, ópticas, magnéticas e citocompatíveis, com o intuito de estimular e/ou desempenhar o papel necessário para favorecer o processo de adesão celular e angiogênese⁽²⁴⁾.

Os materiais biomiméticos, quando utilizados em lesões ósseas, devem proporcionar um arcabouço que possibilite a adesão, migração e proliferação de células de linhagem osteogênica possibilitando deposição de matriz osteóide. Sendo assim, o potencial osteogênico será diferentemente propocional as suas características físico-químicas, como rugosidade, topografia, cristalinidade, resistência mecânica, energia de superfície e a criação de espaços suficientes para angiogênese⁽²⁵⁻²⁷⁾.

O aumento da área de contato de superfície (colágeno, fibronectina, lamina e vitronectina), proporcionando maior atividade celular por meio das integrinas e de receptores da membrana celular⁽²⁴⁾.

2.7 A Bioapatita e a Hidroxiapatita

No corpo humano os principais componentes do tecido mineralizado são o osso, dentina e o esmalte, os quais, são constituídos por fosfato de cálcio, em sua fase mineral (45-70% do peso), água (10% do peso), colágeno (20-45% do peso) e uma pequena proporção de proteínas não colágenas representando a fase orgânica⁽²⁸⁾.

O mineral osso é constituído principalmente por hidroxiapatita de formulação $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ associado a grupos de elementos menores e oligoelementos, que desempenham papel vital nas reações químicas e metabolismo ósseo. A composição da apatita óssea pode variar, devido, aos possuir vários locais cristalográficos, onde as trocas atômicas podem acontecer em muitos elementos diferentes e com cargas iônicas que podem ser substituídos⁽²⁹⁾.

A intenção da utilização dos biomateriais utilizados para reposição óssea encontra-se pautada na capacidade desses materiais de estimular sistemas bioquímicos e celulares, de modo que o material mimetizem a apatita biológica para reposição da perda mineral progressiva^(29,30).

O nome apatita vem do grego “apatites” que significa “enganadora”, onde essa definição está associada a falta de estequiometria desse mineral, pois a um material com deficiência estequiométrica com e similaridade de sua estrutura cristalina dificultam a sua identificação⁽³¹⁾.

As apatitas e seus derivados, têm sido amplamente investigados. A primeira cerâmica utilizada como substituto ósseo foi o gesso em 1894, e o primeiro reparo de defeito ósseo com fosfato de cálcio foi realizado em 1920 por Albee⁽³¹⁾.

O comportamento das bioapatitas deve ser atribuído às suas características, como cristais muito pequenos, com conseqüentemente alta solubilidade, baixa cristalinidade, desordem cristalina e pouca estequiometria⁽³²⁾.

A estrutura na rede das apatitas e suas regiões cristalográficas a tornam susceptíveis a substituições, possibilitando a dopagem com íons diferentes e

substituições de elementos químicos na sua composição. Essas substituições afetam sua cristalinidade (parâmetros de rede e tamanho do cristal) e as suas características químico-físicas (solubilidade)⁽³³⁾.

As apatitas biológicas diferem da HA pura em composição, em estequiometria, morfologia e cristais, apresentam 1,63 para o esmalte, 1,61 para a dentina e 1,71 para o osso, diferente da HA estequiométrica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que possui em sua conformidade de razão de Ca/P de 1,67, assim como, em sua constituição, onde apresenta 39,9% de sua massa de cálcio, 18,5% de fosfato e 3,38% de hidroxila^(34,35).

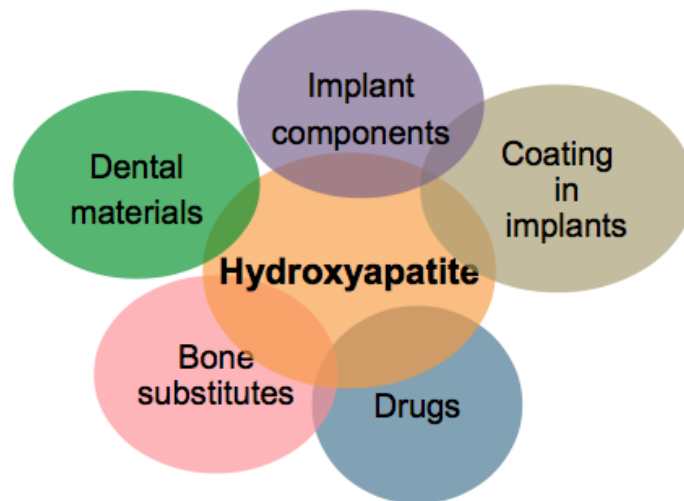


Figura 4 - Demonstando as aplicações da Hidroxiapatita, havendo também correlação entre substitutos ósseos e fármacos, componentes e revestimento de implantes

Fonte: Adaptado de Ratner (2013)⁽⁵¹⁾

A solubilidade é influenciada pela morfologia do material, tamanho do cristal e cristalinidade das apatitas, sendo assim fator preponderante para determinar o seu comportamento *in vivo*, que influenciará na sua dissolução⁽³⁶⁾.

De fato a hidroxiapatita pode acomodar quase metade dos elementos da tabela periódica dentro de sua conformidade, devido a sua alta flexibilidade de sua estrutura. Especificamente as substituições catiônicas ocorrem nos sítios ocupados por Ca^{2+} , e os bivalentes (ex: Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , e etc) como também os monovalentes (ex: Na^+ , K^+ , e etc)⁽³⁷⁾.

Tabela 1 - Composição química e parâmetros de rede do componente mineral do osso, esmalte e dentina em comparação com HA estequiométrica

Element	Bone	Esmalt	Dentin	HA stoichiometric
Cálcio (Ca)	34.80-36.6	36.50-37.60wt%	40.30wt%	39.6 0wt%
Fósforo (P)	15.20-17.10wt%	17.70-18.30wt%	18.60wt%	18.50 wt%
Sódio (Na)	0.90-1.00wt%	0.50-0.70wt%	0.10wt%	
Potássio (K)	0.03-0.07wt%	0.05-0.08wt%	0.07wt%	
Magnésio (Mg)	0.60-0.72wt%	0.20-0.44wt%	1.10wt%	
Estrôncio (Sr)	0.00-0.05wt%	0.03wt%	0.04wt%	
Zinco (Zn)	0.00-39.00ppm	263ppm	173ppm	
Ferro (Fe)	-	118ppm	93ppm	
Prata (Ag)	-	0.60ppm	2ppm	
Manganes (Mn)	0-0.17ppm	0.60ppm	0.60ppm	
Bário (Ba)		125ppm	129ppm	
Alumínio (Al)		86ppm	69ppm	
Cobalto (Co)	0-0.025ppm	0.10ppm	1ppm	
Ouro (Au)		0.10ppm	0.07ppm	
Antimônio(Sb)		1.00ppm	0.70ppm	
Cloro (Cl)	0.10-0.13 wt%	0.30-0.40 wt%	0.27 wt%	
Flúor (F)	0.03-0.10wt%	0.01 wt%	0.07 wt%	
Silica (Si)	0-500pm			
Cromo (Cr)	0.00-0.33ppm	1.00ppm	2.00ppm	
Bromo (Br)		34ppm	114ppm	
Estruturas paramétricas				
α - Axis	9.410/9.49	9.441	9.421	9.430/9.432/9.422
C- Axis	6.890/6.880	6.882/6.880	6.887	6.891/6.881/6.880

Fonte: Elliott (1994); Legeros, RZ (2008)⁽³⁵⁾

Os materiais aloplásticos devem interagir com moléculas do organismo, ser biodegradável, bioativo, biocompatível, não carcinogênico e não tóxico. As características físicas dos biomateriais de fosfato de cálcio estão correlacionadas com o formato e área de superfície podendo ser confeccionado em microesferas, pó, blocos, membranas, telas, esponjas e hidrogéis. Com relação a sua porosidade, pode ser macro, denso ou microporoso, e a sua cristalinidade pode ser cristalino ou amorfo^(38,39).

Para a síntese laboratorial da HA utilizam-se, diferentes técnicas, tais como: precipitação, hidrólise, síntese hidrotérmica ou extraída de recursos naturais (osso de peixe, conchas marinhas, cascas de ovo e osso bovino).

Sucintamente, nos métodos sólidos os reagentes iniciais contendo cálcio e fosfato são misturados e calcinados a altas temperaturas (Aproximadamente 1000°C) por tempo específico, são moídos e a energia mecânica é utilizada para promover reações estruturais.

Os métodos secos não requerem uso de um solvente e os métodos químicos são métodos simples de produção da HA, utilizando vários precursores de fósforo e cálcio⁽³⁹⁾.

No processo sol-gel, uma suspensão coloidal de partículas sólidas é transformada em rede 3D de fase sólida, onde também os precursores são misturados, depois envelhecidos, gelados, secos e calcinados para remover resíduos orgânicos^(40,41).

A síntese úmida está baseada nas reações em solução, sendo realizadas a diferentes temperaturas, utilizando diferentes solventes e aplicando diversos produtos químicos, ciclos em diversos aparelhos e diferentes aditivos para controlar a precipitação. Este método é considerado aquele que, promove a hidroxiapatita mais próxima com do osso humano.

A emulsão permite o controle do tamanho e morfologia e inibe a formação de aglomerados, utilizando materiais de diferentes naturezas (ex: óleo em água)^(40,41).

O processo de combustão produz um produto de alta pureza, utilizando um único passo, necessitando, portanto de um fornecimento de energia para completar a reação de combustão^(40,41).

Na hidrólise, a HA é obtida pela transformação de diversos fosfatos de cálcio, principalmente em, uma solução aquosa⁽⁴²⁾.

A hidrotermal é descrita como uma precipitação química ocorrida em altas temperaturas, sendo utilizados modificadores orgânicos⁽⁴³⁾.

Os métodos sonoquímicos proporcionam a formação de partículas uniformes, na presença de radiação ultra-sonográfica⁽⁴⁴⁾.

Na pirólise as partículas formam reagentes em uma fase gasosa, gerada por evaporação física e pulverizada por um gerador ultra-sônico⁽⁴⁵⁾.

Além dos métodos supracitados, é possível combinar dois ou mais métodos para obtenção da HA com melhores propriedades, características estruturais e combinações hidrotermico-mecânico-químico, hidrotermia-hidrólise, hidrotermico-microemulsão⁽⁴⁶⁾.

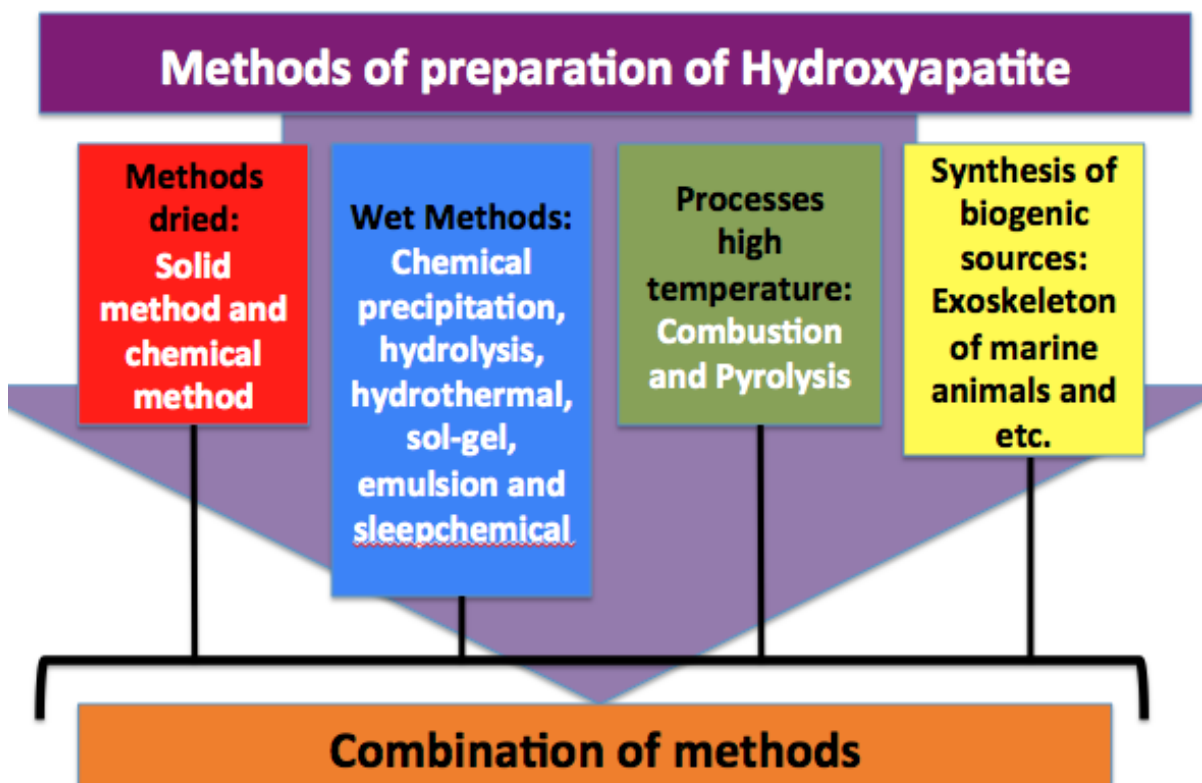


Figura 5 - Organograma adaptado dos diferentes métodos de síntese de hidroxiapatita

Fonte: Adaptado Sadat-Shojai (2013)⁽⁴⁶⁾

As propriedades obtidas dependem do método de síntese, ou seja a razão de Ca/P, temperature, pH, e tempo de geleificação. Além de sua biocompatibilidade esses materiais devem proporcionar viabilidade celular, proliferação, proporcionando espaço adequado para o crescimento.

As fontes biogênicas podem ser organizadas em quatro grupos. No primeiro utiliza-se reagentes da casca do ovo e exoesqueleto de organismos marinhos; o Segundo, a partir de osso cortical bovino; o Terceiro, a partir de biomoléculas derivadas naturalmente e no quarto, utiliza-se a aplicação de radiação de microondas, para ativar a reação⁽⁴⁷⁾.

O tamanho da partícula e porosidade também influencia na área de superfície, onde partículas menores ou iguais a 50µm possuem facilidade de incorporação e melhor adesão as células ósseas⁽⁴⁸⁾.

A temperatura é outro fator importante, sendo 25° à 37° é a temperatura ideal necessária para obtenção no processo de síntese da hidroxiapatita mais próxima a do osso humano e a via úmida é o método que produz a HA mais próxima com o tecido ósseo. Temperaturas muito elevadas não irão proporcionar baixa estequiometria⁽⁴⁹⁾.

Atualmente, as técnicas de impressão 3D atraem grande interesse, como uma ferramenta promissora na produção de substitutos ósseos sob medida para aplicação odonto-médica. Em breve poderá ser possível reestabelecer grandes perdas minerais de maneira exata.

A HA é um material de fácil preparo e apresenta um custo baixo de produção, porém, ainda existe muitos esforços a serem realizados para adequar estruturas bioquímicas, mecânicas e biológicas e com maior poder de regeneração.

Com o avanço científico, vislumbra-se possibilidades de desenvolvimento de materiais com o custo operacional mais reduzido, visto que os substitutos ósseos comercializados no mercado brasileiro ou importados oneram o tratamento. Essas perspectivas impulsiona novas pesquisas que, além de contribuir com o avanço científico nesta área do conhecimento, possibilitam que os tratamentos reconstrutivos possam alcançar as camadas mais carentes, beneficiando assim um maior número de pessoas, que nos países em desenvolvimento como o Brasil, constituem grande contingente populacional.

3 SUBSTITUTOS ÓSSEOS COM METAIS

Entre as matérias primas para obtenção ou associação com biomateriais, os metais possuem destaque devido a alta resistência a fadiga e o grande desempenho mecânico. As aplicações mais comuns são em: parafusos, placas de fraturas, fios, implantes dentários, prótese de articulações, assim como também os substitutos ósseos⁽⁵⁰⁾.

A grande versatilidade dos metais para ser usado com matérias biológicas, deve-se também, à possibilidade de abrasão à superfície, polimento e facilidade em esterilização sem mudar sua conformidade estrutural. Para serem utilizados com segurança no corpo humano, esses metais devem apresentar alguns requisitos mínimos como: ser biocompatível e não produzirem reações inflamatórias, alérgias ou tóxicas, e quimicamente estável⁽⁵¹⁾.

No entanto, as apatitas biológicas são diferentes da HA estequiométrica em vários aspectos, incluindo a falta de estequiometria, as pequenas dimensões dos cristais, assim como a baixa cristalinidade e solubilidade⁽³⁵⁾.

Do ponto de vista químico, considerando as propriedades dos íons, ânions e cátions, que são utilizados em algumas pesquisas, a substituição de um grupamento iônico ou catiônico de um substituto ósseo podem alterar as propriedades biológicas, mecânicas, carga superficial, onde essas substituições modificam a rede de cristalinidade que influenciam substancialmente na solubilidade em condições fisiológicas, conseqüentemente desempenhando mudanças biológicas após a implantação. A facilidade do doping atômico da HA principalmente com metais abriu inúmeras possibilidades de combinações⁽⁵²⁾.

Íons são definidos como átomos eletrizados que ganhou ou perdeu elétrons para o meio, quando o número de prótons é superior em relação ao número de elétrons, é chamado de cátions, que geralmente é formado por metais alcalinos (família IA) e metais alcalinos terrosos (família IIA) da tabela periódica⁽⁵³⁾.

Os cátions que apresentam carga +1 são chamados de monopositivos, os que possuem carga +2 são denominados de dipositivos e assim sucessivamente, ex: Mg^{+2} , Ca^{+2} e Zn^{+2} (53).

Os ânions, possuem carga negativa, pois recebem um ou mais elétrons resultando em um número de elétrons maior com relação aos prótons, podendo ser também, monovalentes (-1), bivalentes (-2) em diante, ex: Cl^{-1} , Br^{-1} , F^{-1} (53).

As apatitas biológicas possuem limitações estruturais, diferentemente da apatitas sintéticas, onde são possíveis substituições como: F-, Cl-, Na+, K+, Fe2+, Zn2, Sr2+, Mg2+, citrato e carbono. Existe limitações para a quantidade de incorporação de íons, entretando, são capazes de incorporar quase metade dos elementos periódicos em sua estrutura atômica(53).

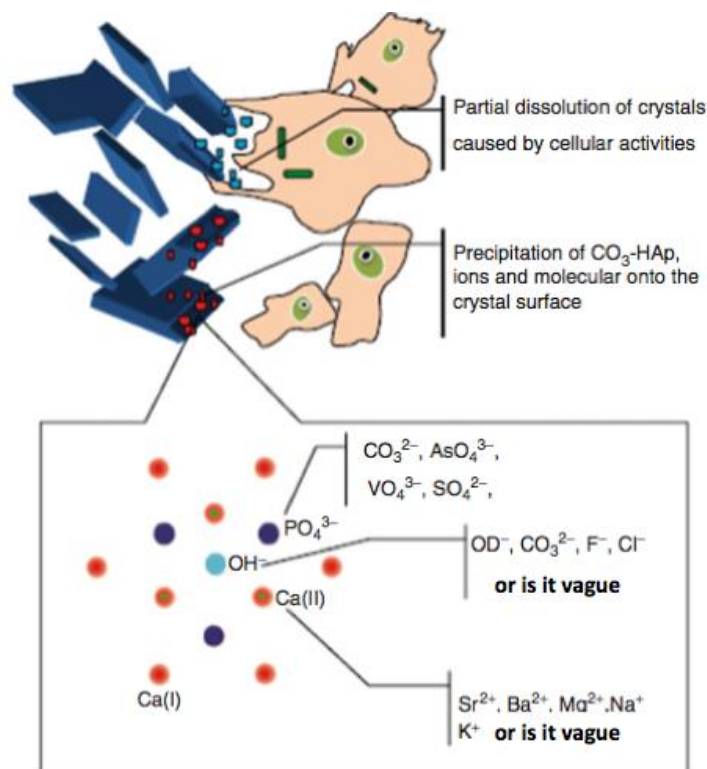


Figura 6 - Desenho esquemático de dissolução parcial/precipitação de apatitas biológicas in vivo e substituições iônicas no cristal de HA Onde é demonstrado que as substituições catiônicas, acontecem no grupamento Ca(II) e as substituições iônicas no grupo hidroxila (OH)

Fonte: Reproduzido da Referência LIU Q, HUANG S, MATINLINNA, JP, CHEN Z, PAN H, (2013)(54).

A HA sintética pura não é ideal para uso como substituto ósseo, devido a sua fragilidade, falta de força e alto grau de cristalinidade, o que resulta na redução da degradabilidade quando é implantada em um sítio. Para possuir propriedades superiores, é indicado dopar com um ou mais metais para melhorar a sua resistência mecânica e formação óssea⁽⁵⁵⁾.

3.1 Magnésio

O magnésio (**Mg**) é um elemento que pertence à família dos alcalinos terrosos, é encontrado sólido nas condições ambientais. É o oitavo elemento mais abundante na crosta terrestre e seus íons desempenham papéis importantes nas atividades de muitas coenzimas e reações de ATP e fazendo parte da estrutura óssea humana (2% em peso)⁽⁵⁶⁾.

Sua deficiência afeta os estágios metabólicos esqueléticos, causando a cessão do crescimento ósseo, diminuição da atividade osteoblástica e osteoclástica, conseqüentemente na fragilidade óssea⁽⁵⁶⁾.

Alguns estudos demonstraram que a deficiência de magnésio está diretamente correlacionada com a osteoporose, influenciando negativamente todos os estágios do metabolismo, com consequência na inibição do crescimento ósseo, atividade osteoclástica e osteoblástica e fragilidade óssea⁽⁵⁶⁾.

A redução progressiva da concentração de Mg^{2+} no início da remodelação, durante o processo de calcificação óssea, é um sinal claro da sua participação no processo de remodelação do osso⁽⁵⁷⁾.

3.2 Zinco

O zinco (**Zn**) é encontrado em temperatura ambiente em estado sólido. Atua no metabolismo de proteínas e ácidos nucléicos, e estimula inúmeras enzimas, auxilia o sistema imunológico, preservação de estruturas e funções da membrana, atividade hormonal e antibacteriana, e na cicatrização de ferimentos.

Pode-se encontrar Zn em todos os tecidos biológicos, entretanto, o osso é seu principal sítio, e sua deficiência está associada a diminuição da densidade óssea⁽⁵⁸⁾.

Alguns estudos demonstrado o grande potencial antibacteriano do Zn, inibindo o crescimento bacteriano e fúngico, incluindo E. coli, S. Aureus, Candida Albicans e S. Mutans, entretanto, necessitando de um teor superior a 1000ppm para exibir um efeito antimicrobiano adequado. Conseqüentemente, o material possuindo maior propriedade antibacteriana, irá miminizar o risco de infecção e reabsorção no processo de remodelação⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾.

3.3 Estrôncio

O estrôncio (**Sr**) é encontrado à temperature ambiente em estado sólido. Este elemento está presente na fase mineral do osso e participa de grandes trabalhos metabólicos⁽⁶²⁾.

A literatura possui diversos estudos utilizando Sr em tratamento de osteoprose, dores ósseas e tratamento de câncer no osso, podendo exercer efeitos duplos de estimulação da diferenciação dos osteoblastos e inibição da atividade dos osteoclastos e reabsorção óssea⁽⁶³⁻⁶⁵⁾.

3.4 Manganês

No corpo humano o Mn afeta a remodelação óssea, e seu deficit causa redução na síntese da matriz orgânica e atrasa a osteogênese endocontral⁽⁶⁶⁾.

A HA dopada de Mn²⁺ irá influenciar fortemente na estabilidade térmica da apatita, além disso irá afetar a bioatividade do material⁽⁶⁷⁾. De todos os metais em estudo é o que possui menos utilização na literatura.

3.5 Ferro

O ferro (**Fe**) é encontrado na natureza em estado sólido. Desempenha papel importante nos processo metabólicos celulares, sendo um elemento fundamental

para a vida nos mamíferos. Sua função é transportar oxigênio no sangue, por intermédio da hemoglobina, existente nos glóbulos vermelhos. Está presente no fígado, baço, ossos, medulla, rins e intestino^(68,69).

Com suas propriedades magnéticas o Fe permite a sua utilização em várias aplicações biomédicas, entretanto, na síntese de materiais um excesso de ferro deve ser evitado, pois afeta a disposição dos átomos^(68,69).

4 PERSPECTIVAS FUTURAS

A busca por um biomaterial ideal que mimetize o tecido mineral perdido continua motivando pesquisadores da área de bioengenharia a descobrir materiais que acelerem a angiogênese, e proporcionem um arcabouço semelhante ao tecido ósseo humano. Na rotina clínico-profissional, o enxerto autógeno extra-oral já está em desuso, ao passo em que o enxerto intra-oral, gradativamente, está sendo substituído pelos biomateriais ou enxertia mistas (autógeno, associado a biomateriais), considerando a diminuição da quantidade de mineral extraído do paciente, com conseqüente, menor morbidade.

A condição de reabsorção e remodelação lenta do biomaterial é muitas vezes uma característica positiva, visto que, possuindo um remanescente preservado, o biomaterial irá ajudar a manter a morfologia, pelo fato de ter uma corticalização lenta.

Os biomateriais estão cada vez mais na rotina clínica do profissional, o que ajuda o desenvolvimento técnico, científico e industrial.

A ciência caminha para uma mudança em nível molecular dos substitutos ósseos, por possuírem biocompatibilidade e biodegradabilidade, que são características básicas, assim como pela a busca de um produto que possa proporcionar a morfologia ideal, trazendo melhor qualidade de vida aos necessitados.

5 CONCLUSÃO

Deve-se ressaltar que, para o desenvolvimento de novos implantes, é necessário utilizar processos metodológicos confiáveis e confiáveis aos estudos laboratoriais controlados na busca do suporte científico e posterior aplicação odontológico-médica, contribuindo para a saúde do futuro gerações.

O enxerto autógeno extra-oral é em desuso para Odontologia e uso muito específico para Medicina.

A hidroxiapatita é atualmente o material escolhido como base para a criação de materiais de enxerto, embora puro não seja o ideal.

A terceira e atual geração de biomateriais está passando por mudanças no nível molecular e pode ter uma função farmacológica associada.

REFERÊNCIAS

1. Bukawa H, et al. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: A review of biomaterials of Scaffolds and implants coatings Dent. Clin. N. Am. 2006; 50, 205-216.
2. Afonso AS. Interação entre biomateriais e tecido ósseo. 1998. 213f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Porto, Portugal.
3. Ahsan T, Nerem RM. Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. Orthod. Craniofacial Res., 2005; 8; 134-140.
4. Andia DC, Cerri PS, Spolidorio LC. Bone tissue: morphological and histophysiological aspects. Revista de Odontologia da UNESP, São Paulo, 2006; 35(2), 191-98.
5. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone, Medical Engineering; Physics, London, 1998; 20, 92-102.
6. Chiara et al. Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineered Bone Tissue Reconstruction. International Journal of Molecular Sciences, Basel, 2012; 13,737-757.
7. Simões RD. et al. Aspectos do Metabolismo Ósseo: Osteoporose. In: Rodrigues L. G; Baracat E. C. Ginecologia Endócrina, 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 272-282. 1995.
8. Shekaran A, Garcia AJ. Nanoscale engineering of extracellular matrix- mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 2011;1810, 350-360.
9. Atwood DA. Bone Loss of edentulous alveolar ridge. J Periodont, 1979, special tissue, p. 11-21.
10. Cardoso AL, et al. Histologia e fisiologia do enxerto ósseo autógeno revisão de literatura. Innovations implant journal, 2006; 1(1), 10-14.
11. Mota NL, et al. Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora de Fora, 2008; v. 27, n.1/2, p.27-32.
12. Zamprogno HCDDM. Evaluation of bone grafting materials in cats: A comparison of cancellous autograft, cancellous allograft and bioglass in a femoral defect model. 2004. Tese de Mestrado. Mississippi State University.
13. Misch CE. Contemporary implant dentistry. 3. ed. St. Louis: Mosby; 2007.

14. Souza MPG. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. *Revista Brasileira de Ortopedia*, São Paulo, 2010; v. 45, n. 3, p. 220-229.
15. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. *Tratado de anatomia Veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 11-16.
16. Croci AT. Retarde de consolidação e pseudoartrose. *Acta Ortopédica Brasileira*, São Paulo, 1997; v. 5, n. 1, p. 26-34.
17. Adams BR, et al., Osteoblast response to nanocrystalline calcium hydroxyapatite depends on carbonate content. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2013; v. 00, p. 00.
18. Mazzone R, Netto HD, Nascimento FF. *Enxertos Ósseos na Implantodontia*. 1ª Edição, Ed Napoleão, São Paulo 2012.
19. Zhang L, Webster, TJ. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* 2009; 4, 66-80.
20. Conz MB, et al. Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft. *J. Appl. Oral Sci.*, 2005; 13, 136-140.
21. Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz JT. Gbureck: *Adv. Drugs Deliv. Rev.* 2013.
22. Kawachi EY, et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*, 2000; 23, 518-522.
23. Muncibì F, Paez DC, Matassi F, Carulli C, Nistri L, Innocenti M. Long term results of percutaneous fixation of proximal humerus fractures. *Indian J Orthop* 2012 Nov-Dec; 46(6): 664–667.
24. Chiara et al. Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineered Bone Tissue Reconstruction. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel 2012, v.13, 737-757.
25. Boyce BF, et al. Recent advances in bone biology provide insight into pathogenesis of bone diseases. *Laboratory investigation*, Baltimore, 1999; 79, 83-94.
26. Burg KJL, Porter S, Kelam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, Amsterdam, 2000; 21(23), 2347-2359.
27. Carano AD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug discovery today*, Oxford, 2003; 8(21), 980-984.
28. Pasteris JD, Wopenka B, Valsami-Jones E. Bone and tooth mineralization: Why apatite? *Elements*. 2008; 4, 97-104.
29. Skinner HCW, et. al. Biominerals, *Mineral. Mag.* 2005; 69,621-641.

30. Mendes Filho AA. Síntese e caracterização de hidroxiapatita e compósitos a partir de matéria-prima reciclada 181 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais)–Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Minas. Rede Temática em Engenharia de Materiais, Ouro Preto, 2006.
31. Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Elsevier, Amsterdam. 1994.
32. Salinas AJ, Esbrit P, Vallet-Regí M. A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair. *Biomater Sci* 2013;1:40–51.
33. Inagaki M, Kameyama T. Phase transformation of plasma-sprayed hydroxyapatite coating with preferred crystalline orientation. *Biomaterials*. 2007;28(19):2923-31.
34. Legeros RZ. Biological and Synthetic Apatites. In: Brown PW, Constantz B. (Org.). *Hydroxyapatite and Related Materials*, Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 3-28.
35. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev* 2008;108:4742–4753.
36. Wopenka B, Pasteris JD. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Mat Sci Eng C-Bio S*. 2005;25(2):131-43.
37. Hughes JM, Rakovan J. The crystal structure of apatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{OH}, \text{Cl})$. In: Kohn MJ, Rakovan J, Hughes JM (eds) *Phosphates: geochemical, geobiological and material importance, reviews in mineralogy and geochemistry*, vol 48. Mineralogical Society of America, Washington, 2002; 1–12.
38. Miguel FB, et al., Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2006; 78, 334-339.
39. Miguel FB, et al., Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2013; 24, 2567-75.
40. Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W, Comparison of *in vivo* dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics, *Biomaterials* 2003; 24,4609–4620.
41. Patel N, Best SM, Bonfield W, Gibson IR, Damien et al., A comparative study on the *in vivo* behaviour of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 2002; 13,1199–1206.
42. Vallet-Regi M, Arcos D. Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants, *J. Mater. Chem.* 2005;15, 1509–1516.

43. Pietak AM, Reid JW, Stott MJ, Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics, *Biomaterials* 2007; 28, 4023–4032.
44. Tang XL, Xiao XF, Liu RF. Structural characterization of silicon-substituted hydroxyapatite synthesized by a hydrothermal method, *Mater. Let.* 2005; 59, 3841 – 3846.
45. Botelho CM, Brooks RA, Best SM, Lopes JD, Santos N, Rushton et al. Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res.* 2006; 79A, 723–730.
46. Sadat-Shojai M, Khorasani M-T, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater* 2013;9:7591-21.
47. Wang Z, Xu Z, Zhaoa W, Sahai N. A potential mechanism for amino acid-controlled crystal growth of hydroxyapatite. *J Mater Chem B* 2015;3:9157-67.
48. Grégoire M, Orly I, Menanteau J. The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities. An in vitro approach. *Journal of Biomedical Materials Research*, Hoboken 1990; 24(2), 165-77.
49. Araújo TS, Santos-Filho JB. Hidroxiapatita pura e dopada com Cr³⁺⁺: produção, propriedades e aplicação em biossensores. 1. ed. Aracaju: [s.n], 2008. Cap. 2, p.13-16.
50. Sumita M, Hanawa T, Teoh SH, *Mat. Sci. Eng.* 2004, 24, 753.
51. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons J. *E em Biomaterials Science – Ann Introduction to materials in medicine.* Eds Elsevier: Oxford, 2013, cap. History of Biomaterials
52. Hao Y, Yan H, Wang X, et. al., Evaluation of osteoinduction and proliferation on nano-Sr-HAP: A novel orthopaedic biomaterial for bone tissue regeneration, *J. Nanosci. Naotechnol.* 2012;12, 207-212.
53. Hughes JM, Rakovan J. The crystal structure of apatite, Ca₅(PO₄)₃(F, OH, Cl). In: Kohn MJ, Rakovan J, Hughes JM (eds) *Phosphates: geochemical, geobiological and material importance, reviews in mineralogy and geochemistry*, vol 48. Mineralogical Society of America, Washington, 2002; 1–12.
54. Liu Q, Huang S, Matinlinna JP, Chen Z, Pan H. 2013.
55. Bigi A, Boanini E, Capuccini C, Gazzo M. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Inorg. Chim. Acta* 2007;360, 1009-1116.
56. Percival M. Bone health & osteoporosis. *Appl Nutr Sci Rep* 1999;5(4):1–5.
57. Bigi A, Foresti R, Gregoriani R, et. al. The role of magnesium on the structure of

- biological apatites, *Calcif. Tissue Int.* 1992; 50, 439-444.
58. Barrea RA, Pérez CA, Ramos AY, et. al. Distribution and incorporation of zinc in biological calcium phosphates, *X-Ray Spectrom.* 2003;32, 387–395.
59. Thian ES, Konishi T, Kawanobe Y, Lim PN, Choong C, Ho B, Aizawa M. Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced, bioactivity and antibacterial properties. *J Mater Sci Mater Med* 2013; 24(2):437–445.
60. Stanic V, Dimitrijevic S, Antic-Stankovic J, Mitric M, Jokic B, Plecas IB, Raicevic S. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. *Appl Surf Sci* 2010;256(20):6083–6089.
61. Velard F, Laurent-Maquin D, Braux J, Guillaume C, Bouthors S, Jallot E, Nedelec JM, Belaouaj A, Laquerriere P. The effect of zinc on hydroxyapatite-mediated activation of human polymorphonuclear neutrophils and bone implant-associated acute inflammation. *Biomaterials* 2010;31(8):2001–2009.
62. Blake GM, Zivanovic MA, McEwan AJ, Ackery DM. SR-89 therapy – strontium kinetics in disseminated carcinoma of the prostate. *Eur J Nucl Med* 1986; 12(9):447–454
63. Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P, Tsouderos Y, Delmas PD, Christiansen C. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* 2001; 28 (4):446–453.
64. Robinson RG, Spicer JA, Preston DF, Wegst AV, Martin NL. Treatment of metastatic bone pain with strontium-89. *Int J Rad Appl Instrum* 1987; 14(3):219–222.
65. Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone* 2008; 42:129–138.
66. Medvecký L, Štulajterova R, Parilak L, Trpčevska J, Džurišin J, Barinov SM. Influence of manganese on stability and particle growth of hydroxyapatite in simulated body fluid. *Colloids Surf A* 2006; 281:221–229.
67. Mayer I, Cuisinier FJG, Popov I, Schleich Y, Gdalya S, Burghaus O, Reinen D. Phase relations between β -tricalcium phosphate and hydroxyapatite with manganese(II): structural and spectroscopic properties. *Eur J Inorg Chem* 2006; 7:1460–1465.
68. Zuo KH, Zeng YP, Jiang D. Synthesis and magnetic property of irons-doped hydroxyapatite, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2012;12. 7096–7100.
69. Pon-On W, Meejoo S, Tang M. Incorporation of iron into nano hydroxyapatite particles synthesized by the microwave process, *Int. J. Nanosci.* 2007;06, 9–16.

MANUSCRITO 02

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA BIOCAMPATIBILIDADE DE MICROESFERAS DE
HIDROXIAPATITA CARBONATADA COM SUBSTITUIÇÕES CATIONICAS**

**Pio MOERBECK-FILHO¹, Suelen C. SARTORETTO², Maurício A. BARRETO³,
Adriana T.N.N. ALVES⁴, Alena R.A.P. MEDRADO³, Mônica D. CALASANS-
MAIA^{6,#}**

¹ Mestrando em Implantodontia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/
Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, Salvador, Bahia, Brasil

² Oral Surgery Department, Universidade Veiga de Almeida, Rio de Janeiro, RJ,
Brazil and Oral Surgery Department, Universidade Iguazu, Nova Iguaçu, RJ, Brazil.

³ Professor adjunto da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador,
Bahia, Brazil.

⁴ Oral Diagnosis Department, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, RJ, Brazil.

⁶ Oral Surgery Department and Clinical Research Laboratory in Dentistry,
Universidade Federal Fluminense, Niteroi, RJ, Brazil.

Corresponding author: Mônica D. Calasans-Maia - Universidade Federal
Fluminense / Faculdade de Odontologia - Rua Mário Santos Braga, nº 30 - Campus
Valonguinho, Centro, Niterói, RJ, Brazil - CEP 24040-110 - Phone: 55 21 98153-
5884 e-mail: monicacalasansmaia@gmail.com

RESUMO

Dentre os biomateriais a base de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita tem sido amplamente utilizada pelas suas características de biocompatibilidade e osteocondução. A substituição cálcio por outros metais e do grupamento fosfato pelo grupamento carbonato associado à ausência de tratamento térmico e baixa temperatura de síntese levam à formação de uma hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada (cHA) contendo múltiplas substituições catiônicas (cHAMetais), que podem otimizar as suas propriedades e mimetizar a apatita biológica. Este estudo objetivou avaliar a biocompatibilidade, biodegradação e osteoindução de microesferas de cHA contendo metais em subcutâneos de camundongos. Os materiais foram caracterizados físico-quimicamente com FTIR, DRX, FRX e BET. Camundongos Balb-C (n=45) foram divididos aleatoriamente em três grupos: cHA (n=15), cHAMetais (n=15) e sem implantação de material (SHAM, n=15). Os grupos foram subdivididos em três períodos experimentais (1, 3 e 9 semanas). As amostras foram processadas histologicamente para avaliação descritiva e semiquantitativa do efeito biológico dos biomateriais segundo a norma ISO 10993-6:2016. A CHAMetais mostrou-se parcialmente biodegradável, entretanto, apresentou reação moderadamente irritante após 1 e 3 semanas e levemente irritante após 9 semanas e não apresentou a propriedade de osteoindução. Estudos futuros com outras concentrações e outros metais devem ser realizados com o objetivo de mimetizar a apatita biológica.

Palavras-Chaves: Biocompatibilidade. Hidroxiapatita Carbonatada. Nanotecnologia. Metais. Camundongos.

ABSTRACT

Among the biomaterials based on calcium phosphate, hydroxyapatite has been widely used because its biocompatibility and osteoconduction. The substitution of calcium by other metals and of the phosphate group by the carbonate group associated with the absence of heat treatment and low synthesis temperature leads to the formation of nanostructured carbonated hydroxyapatite (CHA), containing multiple cationic substitutions (strontium, zinc, magnesium, iron, and manganese, CHAMetals), which can optimize their properties and mimic biological apatite. This study aimed to evaluate the biocompatibility, biodegradation, and osteoinduction of CHAMetals in mice subcutaneous tissue. The materials were characterized physico-chemically with FTIR, DRX, FRX, and BET. Balb-C mice (n=45) were randomly divided into three groups: CHA (n=15), CHAMetals (n=15), and without implantation of material (SHAM, n=15). The groups were subdivided into three experimental periods (1, 3, and 9 weeks). The samples were processed histologically for descriptive and semi-quantitative evaluation of the biological effect of biomaterials according to ISO 10993-6:2016. The CHAMetals group was partially biodegradable; however, it presented a severe irritating reaction after 1 and 3 weeks and moderate irritating after nine weeks and did not show the osteoinduction properties. Future studies with other concentrations and other metals should be carried out to mimic biological apatite.

Keywords: Biocompatibility. Carbonated Hydroxyapatite. Nanotechnology. Metals. Mice. ISO standard.

1 INTRODUÇÃO

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio sintético extensivamente utilizado como substituto ósseo por ser similar química e estruturalmente à fase mineral do osso e também devido às suas propriedades de biocompatibilidade e bioatividade^(1,2), além disso, tem sido utilizada como carreador de drogas em diversas aplicações⁽³⁾. Embora possuam excelentes propriedades físico-químicas, a HA tem sua aplicabilidade clínica limitada, pois as comercialmente disponíveis no mercado são sinterizadas e apresentam baixa taxa de bioabsorção. Em estudo recente, esferas de hidroxiapatita sinterizadas foram implantadas em tíbias de coelhos e após 26, 52 e 78 semanas não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 26 e 78 semanas em relação ao diâmetro e área das esferas, comprovando a sua baixa bioabsorção⁽⁴⁾. Este resultado se deve ao tratamento térmico à 1100°C a que esse material foi submetido resultando em uma estrutura altamente cristalina^(1,4). Portanto, apesar de suas excelentes propriedades, a HA apresenta limitações, principalmente por permanecer por longo tempo no corpo ocupando espaço no qual deveria existir osso neoformado⁽⁵⁾.

Para ampliar a capacidade terapêutica da HA estuda-se modificações na sua composição química e na dimensão dos cristais, tornando-a mais similar ao osso natural. As substituições iônicas nos grupos fosfato (PO_4) e hidroxila (OH), por carbonato (CO_3), permitem a síntese de uma hidroxiapatita carbonatada (cHA) com novas características superando limitações como a baixa bioabsorção⁽⁶⁻⁸⁾. A substituição pode ocorrer tanto no sítio-A (OH) quanto no sítio-B (PO_4). Habibovic et al (2010) concluíram que hidroxiapatitas carbonatadas do tipo-A apresentaram uma maior neoformação óssea *in vivo* quando comparadas com a do tipo-B⁽⁸⁾. Em estudo realizado por Landi et al (2003) a hidroxiapatita carbonatada porosa apresentou duas vezes mais osso do que a hidroxiapatita estequiométrica, além disso também apresentaram as propriedades de biocompatibilidade e bioatividade e foi mais bioabsorvida quando comparada com a HA⁽⁷⁾.

A quantidade de substituições isomórficas que a hidroxiapatita pode sofrer incorporando à sua estrutura diversos íons, pode otimizar seu desempenho clínico, tornando-a mais solúvel, modificando espacialmente a estrutura do seu cristal e

favorecendo sua bioabsorção⁽⁴⁾. Estudos prévios já realizaram a substituição parcial do cálcio por metais como zinco [4,13,14,16,22,51,52] e estrôncio [11,15,21,42,43,44,45,57] capazes de otimizar o reparo ósseo.

Baseado nesse contexto, esse estudo propõe avaliar a biocompatibilidade e biodegradação da hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada modificada por substituições no cristal da HA com múltiplos metais (estrôncio, zinco, magnésio, ferro e manganês) através da implantação em subcutâneo de camundongos, seguindo o padrão de avaliação da Norma ISO 10993-6/2016.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Síntese dos biomateriais

Neste estudo foram utilizadas amostras compostas por partículas menores que 20 nm e estequiometria variando entre $1,6 < \text{Ca/P} < 2,0$ de hidroxiapatita carbonatada contendo múltiplas substituições catiônicas (CHAMETAIS) e amostras de hidroxiapatita carbonatada (CHA), ambas sintetizadas à 37°C e não sinterizadas.

O primeiro ciclo da síntese do biomaterial foi realizado através de precipitação por via úmida utilizando: soluções de nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ e nitrato dos seguintes metais: Sr^{2+} 5%, Zn^{2+} 5%, Mg^{2+} 5%, Fe^{2+} 1% e Mn^{2+} 1%, gotejado no reator, através de duas bombas peristálticas (Bombas Masterflex®) o fosfato de amônio dibásico, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ (0,0175 M) e o carbonato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, com substituição parcial do grupamento fosfato pelo grupamento carbonato.

O pH foi controlado com adição de hidróxido de potássio (Millo® Millipore Corporation) a 37° e filtrado por Buckner, até obter o pH 7,0 sendo controlado por escala. A substituição aniônica do grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$ por $(\text{CO}_3)^{2-}$ $(\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)^{6-x}(\text{CO}_3)^x(\text{OH})^{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y)$ ($0 \leq x \leq 1,1$, $0 \leq y \leq 0,2$) produz um material com estequiometria muito próxima da fase mineral da apatita biológica.

Em seguida, foi realizada a liofilização por 24 horas, obtendo a fase sólida do material, que foi macerado e separado por peneira com abertura de malha de 74 mm.

Após obtenção do pó de hidroxiapatita foi adicionado alginato de sódio (Sigma Aldrich Biochemika, Buchs, Suíça) na proporção 15:1, para dar morfologia as esferas, e adicionado água deionizada a 1% em massa do biopolímero, sendo agitado vigorosamente até homogeneização e obtenção da pasta cerâmica.

2.1.1 Confeccção das esferas

A confeccção das esferas foi realizada utilizando-se agulha de 24G 1 $\frac{3}{4}$ (BD Precision Glide®, Curitiba, PR), para gotejamento do biomaterial no estado fluído, em solução

de cloreto de cálcio 0,15M preparada com reagente de Merck. Após o contato com a solução, inicia-se um processo de geleificação; em seguida, o material obtido é lavado com água deionizada até eliminar a solução salina. Este processo perdura por 24 h.

As esferas obtidas foram separadas em granulometria, através de peneiras inox com malha, variando entre 400 a 600 μm , e subsequentemente, embaladas em frascos de polipropileno (ependroff) e esterilizadas por radiação gama (irradiador de cobalto 60) dose total aplicada nas amostras foi de 15kGy e o tempo total de irradiação foi de 760 minutos. Todo esse ciclo síntese do biomaterial foi realizado Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), Rio de Janeiro, Brasil.

2.2 Caracterização dos biomateriais

2.2.1 Difração de Raio-X (DRX)

Foi realizada a difração de raios x para avaliar a cristalinidade dos materiais e a presença de fases. A análise foi realizada utilizando o difrator de raio-x HZG4 Zeiss com radiação CuK α ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) com varrimento angular de 10-100 e passo de 0,05. Para análise, as amostras foram colocadas em um slide em forma de pó para posterior leitura no aparelho. Utilizou-se o equipamento D2 PHASER.

2.2.2 Espectroscopia vibracional no infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia vibracional no infra-vermelho foi realizada para identificar os grupamentos presentes nos biomateriais. Os espectros de infravermelho para as amostras de cHA em pó foram obtidos usando o espectrofotômetro de transformada de Fourier de Shimadzu, IR-Prestige 21, com um detector de KBr DTGS e um separador de feixe KBr. A análise por transmitância foi realizada usando comprimidos com 1% de KBr na faixa de infravermelho mediano (4.000-40 cm^{-1}). Utilizou-se o equipamento O espectrofotômetro de FTIR IRTracer-100.

2.2.3 Espectroscopia por Absorção atômica

Essa espectroscopia foi realizada para analisar qualitativamente e quantitativamente os elementos de uma amostra através do seu espectro eletromagnético ou de massa. Estas transições apresentam comprimentos de onda específicos formando espectros de absorção e emissão que vão identificar e quantificar os elementos presentes na amostra em análise. Utilizou-se o equipamento Shimadzu AA-7000.

2.2.4 Análise *in vivo*

O presente estudo foi realizado seguindo a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA e as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, ambas disponíveis em <http://concea.mct.gov.br>, sendo o trabalho aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA/UFF:836) da Universidade Federal Fluminense. Além disso, este estudo atendeu as diretrizes do ARRIVE no que concerne os itens relevantes^(58,59).

2.3 Caracterização dos animais

Neste estudo foram utilizados 45 camundongos Balb-C, fêmeas ou machos, pesando de 20 a 35 gramas, fornecidos pelo Núcleo de Animais de Laboratório (NAL), da Universidade Federal Fluminense. Os animais foram aleatoriamente divididos de acordo com os grupos experimentais, CHA, CHAMETAIS e SHAM (coágulo) (n=15) e períodos experimentais de 1, 3 e 9 semanas (n=5). Durante os períodos experimentais os animais foram mantidos em mini-isoladores e alimentados com ração peletizada e água à vontade. Cada mini-isolador foi forrado com raspa de madeira seca (maravalha de pinus), material totalmente atóxico que foi substituído, diariamente, com a finalidade de proporcionar saúde e bem-estar dos animais e mantidos a temperatura de 16 à 20°C.

2.4 Procedimentos de anestesia e cirurgia

Após jejum de 24 horas, todos os animais foram submetidos à anestesia geral por via intraperitoneal com injeção de 0,6 ml de solução anestésica preparada com 1,0

ml de Quetamina a 10% (Dopalen® - 100 mg/ml, Ceva Saúde Animal Ltda., SP, Brasil), 0,5 ml de xilazina a 2% (Anasedan® - 20 mg/ml, Ceva Saúde Animal Ltda., SP, Brasil) e 8,5 ml de solução salina estéril (KabiPac®, Fresenius Kabi Brasil Ltda, SP, Brasil). Cerca de três minutos depois foram realizadas tricotomia e degermação com solução de clorexidina degermante e clorexidina alcoólica 2%, seguindo-se a aposição dos campos cirúrgicos esterilizados previamente, para a delimitação e isolamento do sítio cirúrgico. Uma incisão retilínea na região dorsal de cada animal foi realizada com um cabo de bisturi nº 3 Schwert, A. Schweickhardt GmbH & Co. KG, Tuttlingen Germany e lamina nº 15C, Surgistar, Joinville, SC, Brasil cerca de 10 mm de extensão seguida de divulsão da pele da fáscia muscular com auxílio da tesoura de ponta romba Schwert, A. Schweickhardt GmbH & Co. KG, Tuttlingen Germany, expondo a tela subcutânea para inserção do biomaterial nesta região com a utilização de um medidor padronizado, seguindo a sutura com fio de nylon 5.0 (Ethicon®, Johnson & Johnson, Somerville, NJ, EUA) e antisepsia com gaze e solução alcoólica de clorexidina.

A analgesia pós-operatória foi realizada com Meloxicam® (EuroFarma Laboratórios Ltda., São Paulo, SP, Brasil) 5mg/kg por via subcutânea a cada 24 horas, durante três dias.

2.5 Obtenção das amostras

Decorridos os períodos experimentais de 1, 3 e 9 semanas, os animais de cada grupo experimental receberam dose letal de anestésico geral para coleta das amostras e tecidos circunjacentes com 5 mm de margem de segurança.

2.6 Processamento das amostras

As amostras obtidas foram fixadas em paraformaldeído 4%, durante 48 horas, descalcificadas em solução de EDTA (Biodinâmica®, Ibiporã, PR, Brasil,), desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina. Através dos blocos obtidos, foram realizados cortes de 5 µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina (HE),

Azul de Toluidina (AT) e Tricrômico de Masson (TM) para avaliação histológica descritiva e semiquantitativa.

2.7 Análise histológica descritiva

De acordo com a norma ISO 10993-6:2016 cada amostra de tecido subcutâneo foi cuidadosamente analisada macro e microscopicamente para registrar a extensão de cada reação tecidual observada. A resposta tecidual foi avaliada na área compreendida nas regiões circunjacentes ao implante dos biomateriais e interface.

As lâminas obtidas dos blocos em parafina e coradas com HE foram observadas em Microscópio de Luz de Campo Claro (OLYMPUS BX43, Tokyo, Japan). Essas imagens foram capturadas por uma câmera digital de alta resolução (OLYMPUS SC100, Tokyo, Japan) utilizando lentes objetivas acroplan de 10, 20 e 40x.

A análise descritiva da resposta tecidual aos biomateriais foi avaliada em função da presença de infiltrado inflamatório, neoformação vascular, quantidade de biomaterial remanescente e disposição do mesmo no interior do sítio implantado.

2.8 Análise dos resultados segundo normatização ISO 10993-6:2016

Seguindo a metodologia da Norma ISO 10993-6/2016. A partir de cada lâmina corada com HE foram capturadas 10 fotomicrografias (campos corridos por varredura sem sobreposição) correspondentes as regiões circunjacentes ao biomaterial implantado, utilizando uma lente objetiva de 40x (OLYMPUS SC100, Tokyo, Japan)). A análise semiquantitativa da resposta tecidual (neovascularização, grau de fibrose e infiltrado gorduroso), e a distribuição de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células gigantes), seguiu os parâmetros da norma ISO 10993-6:2016. A diferença entre os escores dos grupos testes e controle classificaram o material de acordo com os seguintes critérios: não irritante (0 à 2,9), irritante leve (3,0 à 8,9), moderadamente irritante (9,0 à 15,0) e irritante severo (>15,0).

3 RESULTADOS

3.1 Difração de Raio-X (DRX)

Os difratogramas correspondentes a o grupo CHA (**Figura** e CHAMETAIS (**Figura 7**) apresentaram padrão de difração de raio-X com picos que correspondem a uma hidroxiapatita (padrão PCPDFWIN 09.0432). Ocorreu uma amplitude nos picos dos grupos estudados, o que caracteriza um material mais amorfo e com cristalinidade diminuída em relação à HA padrão. Os difratogramas dos materiais testados apontam que a substituição parcial das amostras pelo carbonato e a ausência de tratamento térmico ocasionaram uma diminuição na cristalinidade do material.

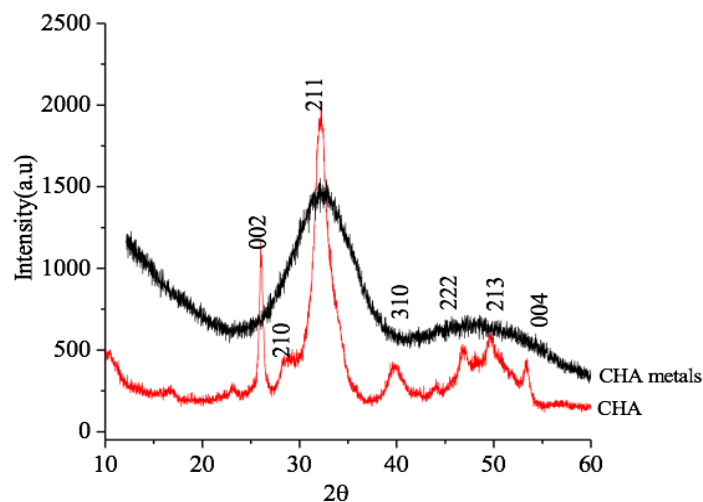


Figura 1 - Difração de Raio-X

3.2 Espectroscopia vibracional no infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR dos grupos CHA e CHAMETAIS (Figura 8) são constituídos por bandas vibracionais da hidroxiapatita em 1094 cm^{-1} , 1031 cm^{-1} , 961 cm^{-1} , 607 cm^{-1} , 562 cm^{-1} , (grupos fosfatos). As bandas observadas em 1444 , e 876 cm^{-1} são típicas de íons carbonato na estrutura da hidroxiapatita o que confirma que a substituição de íons carbonatos ocorreu segundo a proposta de síntese. As bandas observadas em 3574 cm^{-1} e 634 cm^{-1} são características do grupo hidroxila $(\text{OH})^{-1}$

3.4 Análise histológica descritiva

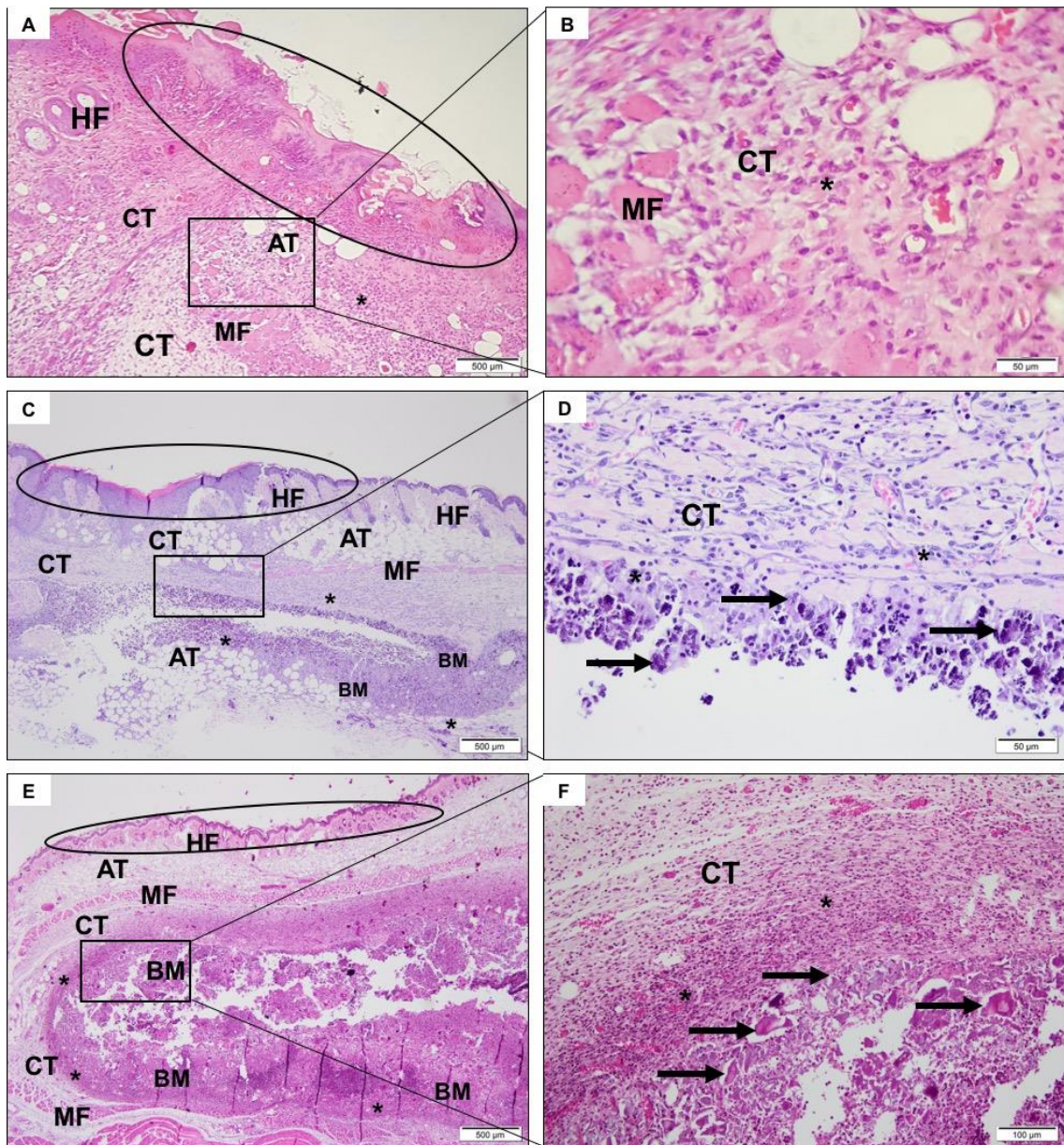


Figura 3 - Fotomicrografias representativas da região de implantação dos grupos SHAM (A e B), CHA (C e D) e CHAMetals (E e F) 1 semana após o implante. Círculo (A, C, E): epiderme e derme papilar com folículo piloso (IC), recuperando tecido conjuntivo (TC) com células focais intensas e inflamatórias (*); são observadas fibras musculares (MF) e tecido adipocito (AT). A zona biomaterial (BM), especificamente em C e E. (B), detalha em maior objetivo as fibras musculares desorganizadas (MF) permeadas por tecido conjuntivo (CT) e infiltrado inflamatório (*). (D, F) detalha em maior objetivo, biomaterial particulado (seta) intermediado por tecido conjuntivo (CT) com células mononucleares inflamatórias predominantemente (*). A, C e D, ampliação de 40 x, barra de escala: 500µm; B, D e F, ampliação de 400 x, barra de escala: 50µm. Coloração com hematoxilina e eosina.

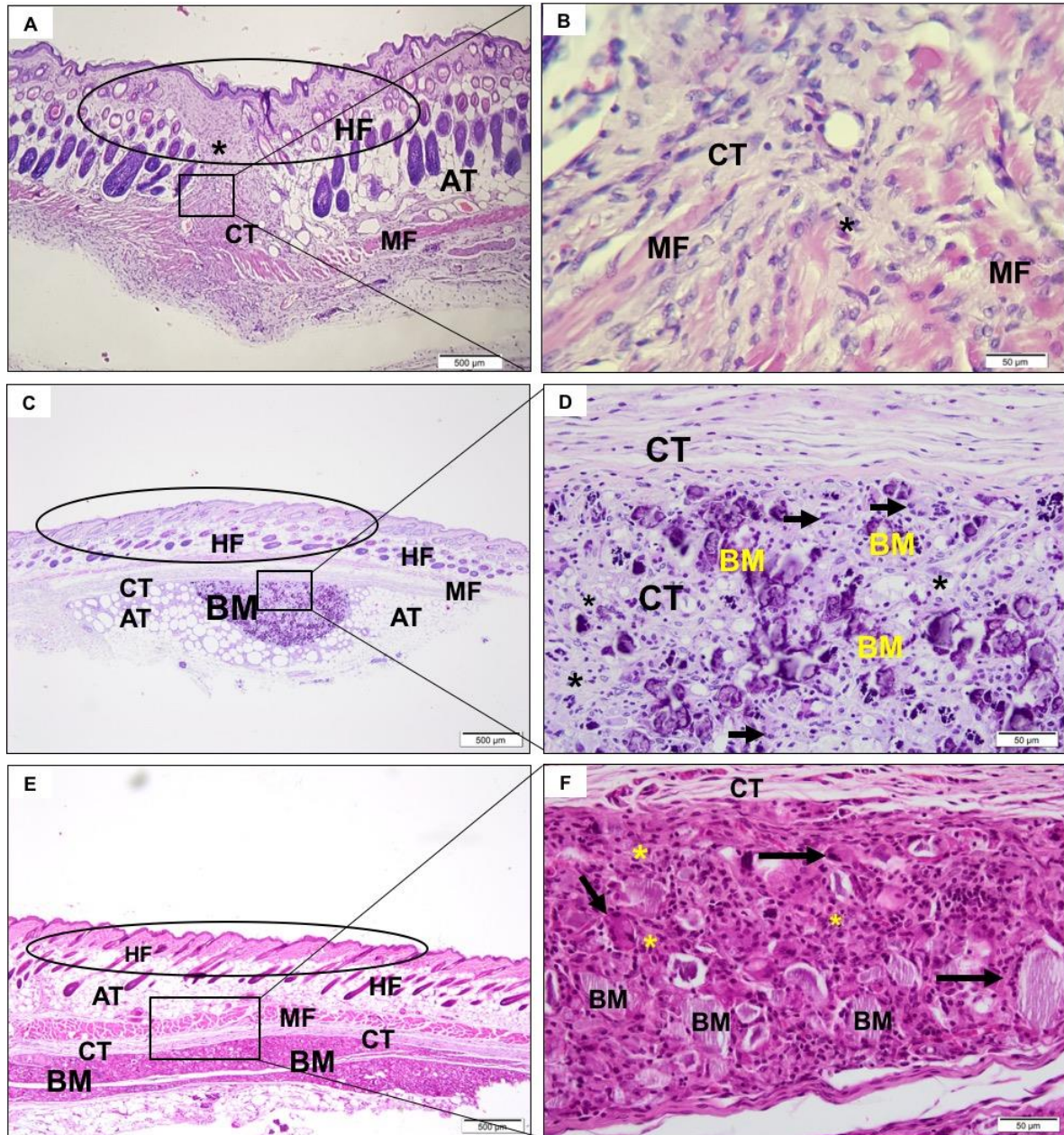


Figura 4 - Fotomicrografias representativas da região de implantação dos grupos SHAM (A e B), CHA (C e D) e CHAMetals (E e F) três semanas após o implante. Círculo (A, C e E): epiderme e derme papilar com folículo piloso (IC), recuperando tecido conjuntivo (TC) com células inflamatórias (*); fibras musculares (MF) e tecido adipocito (AT). Nota: Reação de granulação C e E na zona de biomaterial (BM). (B) detalhe no objetivo mais alto, fibras colágenas e musculares no processo de organização com células inflamatórias moderadas. (D e F) detalham no mais alto objetivo, biomaterial particulado (BM) intermediado por tecido conjuntivo (CT) com reação de granulações (*); células gigantes multinucleadas foram observadas (seta black). A, C e D, ampliação de 40 x, barra de escala: 500μm; B, D e F, ampliação de 400 x, barra de escala: 50μm. Coloração com hematoxilina e eosina.

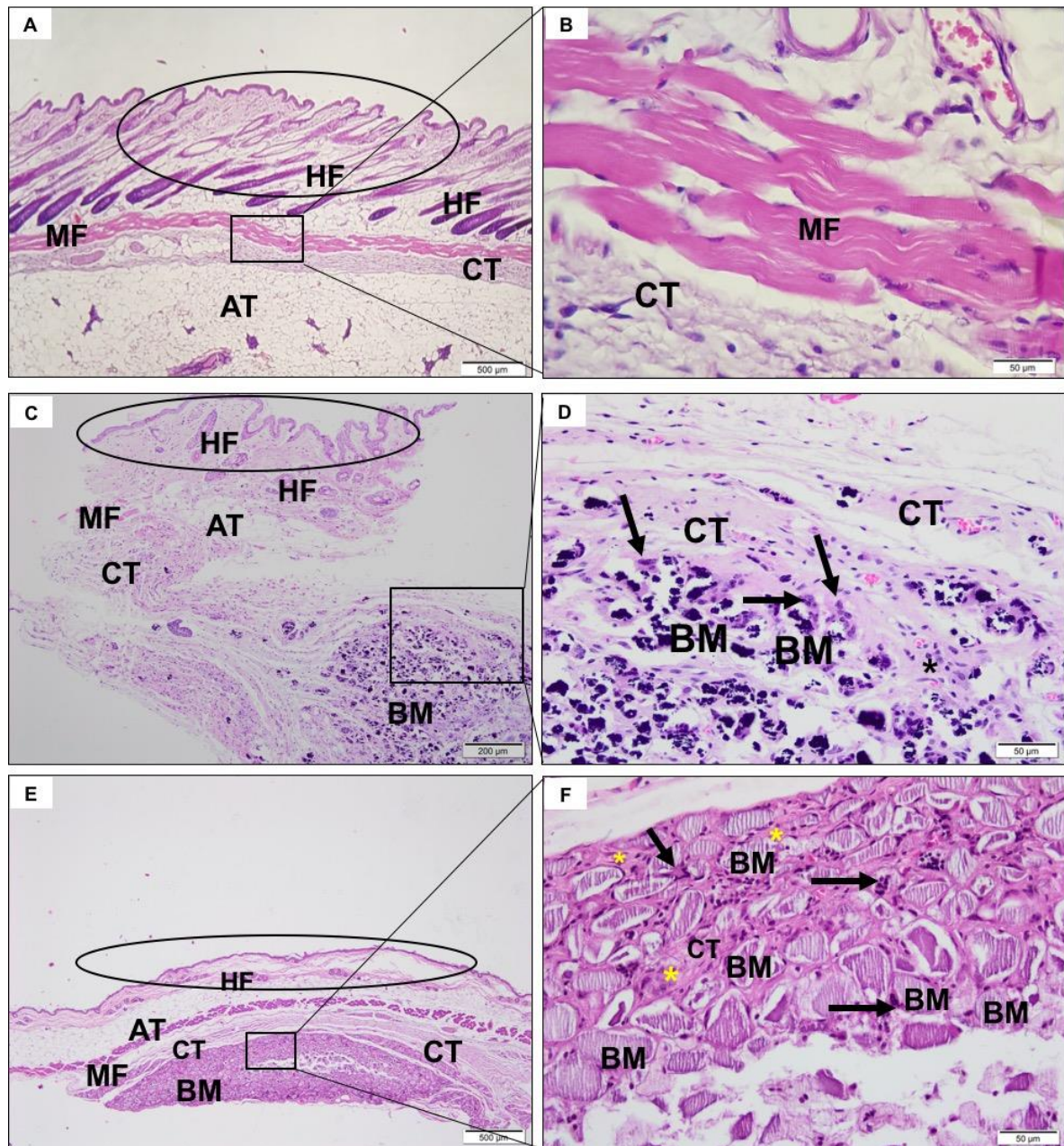


Figura 5 - Fotomicrografias representativas da região de implantação dos grupos SHAM (A e B), CHA (C e D) e CHAMetals (E e F) 9 semanas após o implante.

(A, C e E): círculo: epiderme e derme papilar com folículo piloso (IC), recuperando tecido conjuntivo (TC) com células inflamatórias (*); fibras musculares (MF) e tecido adipocito (AT). Observe em C e E a reação de granulação na zona biomaterial (BM). (B) detalhe em maior objetivo, colágeno maduro e fibras musculares. (D e F), no objetivo mais alto, foi observado biomaterial particulado (BM) intermediado por células inflamatórias do tecido conjuntivo fibroso (ct) (*) e células gigantes multinucleadas (seta de black). A, C e D, ampliação de 40 x, barra de escala: 500μm; B, D e F, ampliação de 400 x, barra de escala: 50μm. Coloração com hematoxilina e eosina.

Grupo SHAM: No primeiro período experimental, foi observado infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico na região da incisão, compatível com o procedimento cirúrgico. Após 3 e 9 semanas o tecido estava em processo de cicatrização sem sinais de inflamação

CHA: Após uma semana foi possível observar a presença do biomaterial, sem sinais de degradação. Houve recrutamento de macrófagos, células gigantes multinucleadas e infiltrado neutrofílico moderado permeando o biomaterial (**Figuras 3b, 4j**). Após três semanas as esferas já se apresentavam de forma fragmentada e em menor volume, apresentando células gigantes envolvendo diretamente o biomaterial **Em nove semanas** não foi observado redução de volume biomaterial em relação ao período anterior, entretanto, houve uma diminuição do infiltrado neutrofílico e células gigantes

CHAMETAIS: No primeiro período experimental houve presença de moderado infiltrado inflamatório polimorfonucleares, células mononucleadas e vasos sanguíneos que se distribuíram de forma concêntrica ao redor do biomaterial implantado. As fibras colágenas do tecido conjuntivo se organizaram de modo a “encapsular” o biomaterial. Em 3 semanas, demonstraram a persistência de tecido de granulação típico, com infiltrado inflamatório, predominantemente linfoplasmocitário, com macrófagos e células gigantes multinucleadas em meio a vasos sanguíneos. Este tecido circundava o local da enxertia do biomaterial. As células gigantes pareciam englobar algumas partículas do biomaterial. A disposição concêntrica das fibras colágenas persistiu. Em 9 semanas foram observadas características morfológicas semelhantes ao período anterior. Houve persistência de células inflamatórias monomorfonucleares (principalmente macrófagos e linfócitos) e células gigantes multinucleadas adjacentes ao BM e organização de feixes colagênicos mais espessos que circundavam o local da enxertia (

3.5 Grau de irritação dos biomateriais de acordo com a normatização da ISO 10993-6:2016

Após avaliação descritiva dos biomateriais implantados pela CHA e CHAMetals, uma análise semi-quantitativa foi aplicada usando o sistema de pontuação fornecido pela

norma ISO 10993-6. Os escores foram conduzidos de acordo com os padrões ISO para comparar a resposta inflamatória tecidual entre os grupos. A Figura 6 demonstra as respostas inflamatórias das células inflamatórias (Figura 6A-F), bem como a reação geral do tecido (Figura 6G-I) com os resultados finais calculados relatados na Figura 7. Os resultados completos são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3 suplementares. Os grupos SHAM e CHA, controle negativo e controle positivo, respectivamente, permaneceram, nos 3 períodos experimentais (1, 3 e 9 semanas), na classificação "irritante leve" (de 3,0 a 8,9 na ISO escala). O grupo experimental CHAMetals apresentou um pico de células inflamatórias na primeira e terceira semanas, quando comparado aos outros dois grupos, com migração mais significativa de células de defesa para a região do defeito e é classificado como "irritante grave" (> 15,0) de acordo com o nível previsto pela norma ISO. Após nove semanas, o grupo CHAMetals foi considerado um "irritante moderado".

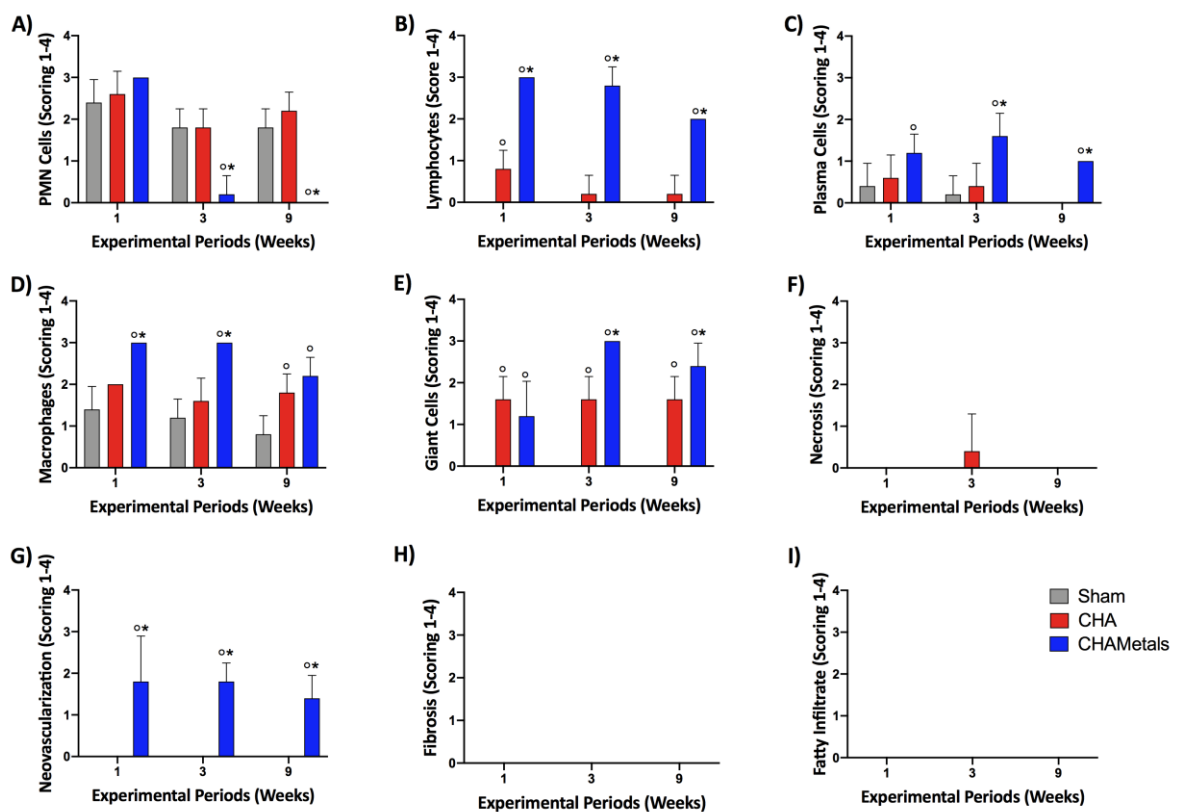


Figura 6 - Resposta das células inflamatórias (6A-F) e reação geral do tecido (6G-I). Observe que os grupos CHA responderam extremamente favoravelmente com apenas aumentos leves na inflamação quando comparados ao controle Sham negativo. O grupo CHAMetals apresentou reação inflamatória mais intensa quando comparado aos outros grupos (dados +/- desvio padrão; $p < 0,05$; (°) representa

significativamente maior quando comparado ao grupo Sham; (*) representa significativamente maior quando comparado ao CHA grupo.

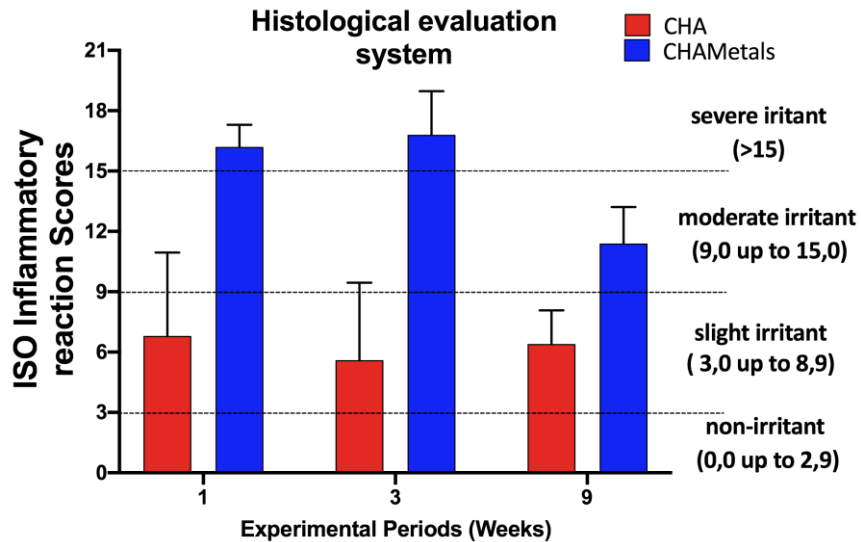


Figura 7 - Escore de reação inflamatória de acordo com a ISO 10993-6: 2016. As diferenças entre as pontuações dos grupos CHA e CHAMetals subtraíram do controle (SHAM). Os grupos foram classificados de acordo com os critérios da ISO 10993-6: 2016: Não irritante (0,0 a 2,9); ligeiramente irritante (3,0 a 8,9); moderadamente irritante (9,0 a 15,0); seriamente irritante (> 15); a caixa é representada como valores médios, mínimos e máximos.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, os camundongos foram utilizados devido a facilidade com o manuseio, custos e sítio de implantação possível (subcutâneo) de acordo com a norma ISO 10993-6:2016. A formação óssea ectópica induzida experimentalmente é bem descrita na literatura, e só pode ser avaliada em sítios subcutâneo ou intramuscular, visto que esses sítios não possuem propriedades regenerativas próprias. Em um estudo que avaliou um biomaterial implantado no tecido subcutâneo⁽²³⁻²⁵⁾, mostrou que após 10 dias houve um aumento de células gigantes multinucleadas e livre de linfócitos e plasmócitos e a medida que o período experimental avançou, o infiltrado inflamatório diminuiu, esses resultados corroboram com os nossos resultados com presença de células gigantes e células inflamatórias no período de 7 dias e tempo dependente para redução das células. Em outro estudo experimental no subctâneo^(26,28), onde se utilizou rhBMP-2 associado a materiais de enxerto mostrou a formação óssea, no nosso estudo como não foi associado ao biomaterial outro material osteoindutor não foi observado até o último período experimental a presença de osso novo ectópico.

Existem diversos métodos de preparação da HA, podendo ser obtida a partir de métodos secos, métodos úmidos, processos de alta temperatura, através de fontes biogênicas, combinações de métodos, hidrotérmicas e reações em estado sólido. Em um levantamento na literatura, apontou claramente a prevalência da utilização do método por precipitação, mesmo método que foi utilizada no presente estudo^(9,10,27,31,36,56). O desenvolvimento da HA por via úmida possui idiosincrasia similares ao tecido dentário e ósseo, devendo ser controlado a relação de Ca/P nos reagentes, pH, temperatura de síntese, tempo de reação e geleificação, sendo fatores preponderantes para estequiometria e cristalinidade do material^(20,35,37,38). Em uma pesquisa clínica, onde foi obtido a hidroxiapatita por precipitação, as análises histológicas e radiográficas demonstraram crescimento ósseo⁽²⁹⁾.

A temperatura de síntese é fator importante na resposta biológica ao biomaterial, sendo considerada a temperatura ideal e necessária entre 25° à 37° para obtenção da hidroxiapatita com a cristalinidade mais próxima do osso humano. Temperaturas muito elevadas irão proporcionar baixa estequiometria^(32,33).

Em outro estudo de hidroxiapatita carbonatada a 37°, a mesma temperatura de síntese do presente estudo, comparada com uma HA obtida no processamento de cerâmicas sinterizadas (a 1200°), mostrou que aquela sintetizada por temperatura menor apresentou uma maior proliferação celular e fibroblástica, mostrou também, maior concentração de Ca_{2+} na MEC, com diferença entre elas nos parâmetros físicos, tais como: porosidade e morfologia do cristal⁽³²⁾. Estas pesquisas supracitadas^(31,32) reforçam a utilização de temperaturas medianas utilizadas no presente estudo (37°). Entretanto, em outro estudo comparativo de diversas temperaturas de sinterização de hidroxiapatita (600°, 800°, 1000° e 1200°), mostrou que o maior aumento da temperatura proporciona maior estabilidade da há⁽³³⁾.

O mercado de biomateriais aponta a utilização em partículas ou grânulos entre 400 à 600µm, onde diversas marcas comerciais utilizam esta proporção, corroborando com a nossa metodologia, onde se utilizou as mesmas medidas^(18,19,22). Em nossa pesquisa, utilizamos o biomaterial em formatos de esferas, formato esse que não é apresentado no mercado, entretanto, a literatura respalda o presente trabalho, evidenciando que formato esferas apresenta melhor resposta biológica⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Um relevante número de pesquisas sobre a produção de HA e o efeito das suas substituições iônicas, catiônicas e mútuas combinações, demonstram novas propriedades mecânicas, biológicas, físicas e químicas^(34,35). De fato, a hidroxiapatita pode acomodar uma grande quantidade de elementos da tabela periódica dentro de sua conformidade, devido a sua alta flexibilidade de sua estrutura^(35,36). Especificamente, as substituições catiônicas ocorrem nos sítios ocupados por Ca^{2+} , e os bivalentes (ex: Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , e etc) e também monovalentes (ex: Na^+ , K^+ , e outros)⁽³⁶⁻⁴⁰⁾.

No que concerne aos metais, a literatura aponta que o estrôncio (Sr^{2+}) é utilizado em tratamentos de osteoporose, dores ósseas e câncer ósseo e pode exercer efeitos duplos de estimulação óssea. Estudos sugerem que a incorporação de Sr aos fosfatos de cálcio parece favorável ao reparo ósseo devido as suas propriedades de indução na formação óssea⁽⁴¹⁻⁴³⁾. Em um estudo *in vitro*⁽⁴⁴⁾, foi comparado Sr a 5% e a 10%, sendo constatado que a 5% possuía maior resistência à compressão, contudo, ainda não se sabe a dosagem ideal de Sr^{45} para incorporação ao fosfato de

cálcio. Na presente pesquisa utilizou-se 5%, entretanto não corrobora com os achados das pesquisas anteriores, provavelmente pela associação com outros metais diferente dos estudos anteriores que substituíram parcialmente o cálcio pelo Sr.

As pesquisas relacionadas a magnésio (Mg) mostram sua participação no processo de remodelação óssea⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾, e também demonstram sua participação no crescimento ósseo e atividade osteoblástica⁽⁴⁹⁾. Em um estudo recente, foi verificado que o Mg quando incorporado ao BM proporciona uma melhora de 4 a 5 vezes em relação ao reparo ósseo quando comparado ao grupo controle⁽⁴⁷⁾. Os resultados descritos das pesquisas acima não corroboram com o presente estudo.

Alguns estudos têm demonstrado o potencial antibacteriano do Zinco (Zn), inibindo o crescimento bacteriano e fúngico, E. Coli, S. Aureus, Candida Albicans e S. Mutans, entretanto, necessita de um teor superior a 1000ppm para exibir um efeito adequado⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. Consequentemente, o material com propriedades antibacterianas, irá minimizar o risco de infecção e reabsorção no processo de remodelação⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. Em uma revisão sistemática, foi verificado que a concentração de Zn pode influenciar de 7 a 8% a mais no reparo⁽⁵¹⁾. Em um estudo recente de hidroxiapatita carbonatada contendo Zn implantada em tecido subcutâneo de camundongos, mostrou que a dopagem com Zn não alterou a biocompatibilidade do material, entretanto alterou a bioabsorção⁽⁵²⁾. A justificativa da utilização do Zn no presente estudo foi baseada em suas p descritas em estudos anteriores⁽⁵⁰⁻⁵²⁾.

O ferro (Fe), presente no sangue, desempenha papel importante nos processos metabólicos celulares, transporte de oxigênio, entretanto, segundo a literatura deve ser evitado em grande concentração, pois afeta a disposição dos átomos^(53,54), corroborando com a presente pesquisa onde utilizou-se 1%.

Segundo a literatura, a HA dopada com manganês (Mn) pode influenciar fortemente na estabilidade térmica da apatita além de afetar na bioatividade do material^(12,29,55).

Perante à luz da literatura, Mn e Fe são os metais que apresentam menor evidências científica associados a HA, e foram incorporadas ao material de teste no intuito de

simular a apatita biológica que apresenta vários metais em sua constituição e avaliar como se comportariam em conjunto.

Na avaliação semiquantitativa do presente estudo (ausente, leve, moderada e severa), embora não tenha havido sinais de necrose, foi detectado que o infiltrado inflamatório do grupo experimental apresentou um pico que depois regrediu, o que, de certo modo já era esperado, visto que o biomaterial é um corpo estranho com consequente aumento na migração das células de defesa de ciclo curto. Com base na norma ISO, esta reação corresponde à classificação “irritante moderado” (9,0 à 15,0), nos períodos de 1 e 3 semanas. Após 9 semanas no grupo experimental, houve uma queda de células inflamatórias, e o biomaterial se tornou “levemente irritante”, concluindo-se assim um resultado intermediário, de acordo com a norma ISO 10993-6/2016.

Sobre a avaliação histológica do CHAMETAIS, após uma semana, houve presença de moderado infiltrado inflamatório polimorfo e monomorfonuclear e vasos sanguíneos que se distribuíram de forma concêntrica ao redor do material enxertado. A coloração com TMA revelou arranjo semelhante, com relação às fibras colágenas do tecido conjuntivo, as quais se organizaram de modo a “encapsular” o biomaterial. Após três semanas os aspectos histopatológicos teciduais obtidos demonstraram a persistência de tecido de granulação típico, com infiltrado inflamatório, predominantemente linfo-plasmocitário, com macrófagos e células gigantes multinucleadas em meio a vasos sanguíneos, que buscavam aparentemente englobar o biomaterial.

Na 9ª semana, foram observadas características morfológicas semelhantes ao período de 3 semanas. Houve persistência de células inflamatórias monomorfonucleares e células gigantes multinucleadas adjacentes ao biomaterial. É importante ressaltar que a presença de células gigantes multinucleadas e macrófagos pode ser uma tentativa do organismo reabsorver o material, não sendo necessariamente, falta de biocompatibilidade⁽⁴⁹⁾. Do ponto de vista biológico, justifica-se a presença destas células ao redor da CHAmetais, devido ao material estar em formato de esferas pequenas e à presença de partículas suscetíveis à fagocitose. A literatura respalda que o implante de biomateriais sintéticos à base de

HA em tecido subcutâneo resulta em um tipo de reação granulomatosa e de corpo estranho no sítio receptor^(24-26,28).

Conforme achados da presente pesquisa, a análise de mastócitos no grupo teste (CHAmetais), mostrou que à medida que o tempo experimental avançou, a quantidade de mastócitos aumentou, concomitantemente, o que demonstra que o organismo necessita de maior número de células do tecido conjuntivo, para estabelecer homeostasia do meio.

A associação dos metais de maneira separada, se mostrou auxiliar na neoformação óssea em vários estudos^(21,25,26,28,33,40,42-45,51) entretanto, na presente pesquisa a adição dos cinco metais juntos, não evidenciou uma melhor resposta biológica.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se definir o biomaterial utilizado como razoavelmente biodegradável e moderadamente irritante. O grau de inflamação precoce foi considerável, sendo preponderante para bons resultados clínicos, entretanto, recomenda-se ajustes no biomaterial, através de novos estudos translacionais.

5 CONCLUSÃO

O biomaterial experimental apresentou um comportamento moderadamente irritante após uma e três semanas e levemente irritante após nove semanas, foi parcialmente bioabsorvido e não apresentou a propriedade de osteoindução. Estudos futuros com outras concentrações e outros metais devem ser realizados com o objetivo de mimetizar a apatita biológica.

REFERÊNCIAS

- 1 Legeros JP. Hidroxyapatite, In: bioceramics and their clinical application. 2008.
- 2 Kozo O. Quantitative study on osteoconduction of apatite-wollastonite containing glass ceramic granules, hydroxyapatite granules and alumina ganules.1990.
- 3 Krajewsky A, et al. Synthesis of carbonated hydroxyapatites: efficiency of the substitution and critical evaluation of analytical methods. *Journal of Molecular Structure*, 2005; 744 -747:221-228.
- 4 Resende RF, et al. Long-term biocompatibility evaluation of 0.5 % zinc containing hydroxyapatite in rabbits. *J.Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2013; 24, 1455- 63.
- 5 Saijo H, Chung UI, Igawa K, Mori Y, Chikazu D, Iino M, et al. Clinical application of artificial bone in the maxillofacial region. *J ArtifOrgans*. 2008; 11:171-6.
- 6 Landi E, Sprio S, Sandri M, Celotti G, Tampieri A. Development of Sr and CO₃ co-substituted hydroxyapatites for biomedical applications. *ActaBiomater* 2008;4:656-63.
- 7 Landi A, et al. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. *Journal of the European Ceramic Society*, 2003; 23, 2931-2937.
- 8 Habibovic P, Juhl MV, Clyens S, Martinetti R, Dolcini L, Theilgaard N, et al. Coparison of two carbonated apatite ceramics in vivo. *ActaBiomater*. 2010;6:2219-26.
- 9 Sartoretto S, Resende R, Uzeda M, Alves A, Arantes E, Louro R, Calasans-Maia J, Rossi A, Granjeiro J, Calasans-Maia M. Randomized clinical trial for histomorphometric and histological evaluation of nanostructured and resorbable calcium phosphate as a bone substitute. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2019; 48, 208-209.
- 10 Michal W, Ewa D, Tomas C. Lecithin-based Wet Chemical Precipitation of Hydroxyapatite Nanoparticles, *Colloid Polym Sci*. 2015; 293(5): 1561–1568.
- 11 Chandran S, Babu SS, Vs HK, Varma HK, John A. Osteogenic efficacy of strontium hydroxyapatite micro-granules in osteoporotic rat model. *J Biomater Appl*. 2016;31(4):499–509. doi:10.1177/0885328216647197.
- 12 Mayer I, Cuisinier FJG, Popov I, Schleich Y, Gdalya S, Burghaus O, Reinen D. Phase relations between β -tricalcium phosphate and hydroxyapatite with manganese(II): structural and spectroscopic properties. *Eur J Inorg Chem* 2006;7:1460–1465.
- 13 Calasans-Maia MD, Fernandes GVO, Rossi AM, Dias EP, Almeida GDS, Mitri FF, Granjeiro JM. Effect of Hydroxyapatite and zinc-containing hydroxyapatite on

- osseous repair of critical size defect in the rat calvaria. *Key Engineering Materials* 2008, v. 361, p. 1273-1276.
- 14 Fernandes, et. al., Histomorphometric Analysis of Bone Repair in Critical Size Defect in: Rats Calvaria Treated with Hydroxyapatite and Zinc-Containing Hydroxyapatite 5%. *Key Engineering Materials* 2009;396-398, 15-18.
 - 15 Machado, et. al. Avaliação da hidroxiapatita contendo estrôncio como substituto ósseo em tíbias de ovelhas. *Innov Implant J, Biomater Esthet, São Paulo*, 2010; 5(1), 9-14, jan./abr.
 - 16 Nascimento L, et. al. Osseointegration evaluation of hydroxyapatite and zinc containing hydroxyapatite granules in rabbits. *Key Engineering Materials* 2012; 493-494, 252-257.
 - 17 Lebre, et. al. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation, *Scientific Reports* | 7: 2922 | DOI:10.1038/s41598-017-03086-0, 2017.
 - 18 O'Donnell CJ, Rao DSP, Battese GE. Metafrontier frameworks for the study of firm-level efficiencies and technology ratios. *Empirical Economics* 2008; 34, 231–255.
 - 19 Patel N, Best SM, Bonfield W, et al. A comparative study on the *in vivo* behaviour of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules, *J. Mater. Sci.- Mater. Med.* 2002;13(12), 1199–1206.
 - 20 Barralet J, et al., Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: an investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998; 41, 79-86.
 - 21 Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation *in vitro*. *Bone* 1996;18(6):517–523.
 - 22 Mayer I, et al. Zinc ions in synthetic carbonated hydroxyapatites. *Archs. Oral Biol.* 1994; 39, 87-90.
 - 23 Barros E, Alvarenga J, Gutemberg Alves G, et. al. *In vivo* and *in vitro* biocompatibility study of nanostructured carbonate-apatite. *Key Engineering Materials* 2012; 493-494, 247-251.
 - 24 De Lima, et al. Resposta do tecido subcutâneo de camundongos à implantação de um novo biovidro à base de óxido de nióbio. *Revista Matéria*, 2011; 16(1), 574 – 582.
 - 25 Zambuzzi, et al. Rat Subcutaneous Tissue Response to Macrogranular Porous Anorganic Bovine Bone Graft. *Key Engineering Materials* 2012; 493-494.
 - 26 Lee S, et al. Comparative Study of Recombinant Human Bone Morphogenetic

- Protein-2 Carriers in Rat Subcutaneous Tissues: Pilot Study. *Tissue Eng Regen Med*; 2015; 12(Suppl 2):138-146.
- 27 Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi Ahmad. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater* 2013;9(8):7591- 621.
- 28 Avula NM, et. al. Foreign body response to subcutaneous biomaterial implants in a mast cell deficient Kit^{w-Sh} murine model *Acta Biomaterialia* 2014;10, 1856–1863.
- 29 Mayer I, Cuisinier FJG, Popov I, Schleich Y, Gdalya S, Burghaus O, Reinen D. Phase relations between β -tricalcium phosphate and hydroxyapatite with manganese(II): structural and spectroscopic properties. *Eur J Inorg Chem* 2006;7:1460–1465.
- 30 Mota NL, et al. Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora de Fora*, 2008; 27(1/2), 27-32.
- 31 Ramirez CAO, et. al. Structural Properties of Nanostructured Carbonate Apatites. *Key Engineering Materials*. 2008; 396-398, 611-614.
- 32 Nazarian H, Pourbaghi-Masouleh M, Borhan S. Comparative study of mesenchymal stem cells osteogenic differentiation on low-temperature biomineralized nanocrystalline carbonated hydroxyapatite and sintered hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2013; 1.
- 33 Guo L, Mei H, Zhang X. Effects of sintering temperature on structure of hydroxyapatite studied with Rietveld method. *Journal of Materials Science: Materials In Medicine* 2003; 817±822.
- 34 Grégoire M, Orly I, Menanteau J. The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities. An in vitro approach. *Journal of Biomedical Materials Research, Hoboken* 1990; 24(2),165-77.
- 35 Rigo ECS, Gehrke SA, Carbonari M. Síntese e caracterização de hidroxiapatida obtida pelo método de precipitação. *Revista Dental Press de Periodontia e Implantologia* 2007;1, 39-50.
- 36 Santos ML, Florentino AO, Saeki, MJ, Aparecida AH, Fook MVL, Guastaldi AC. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. *Eclética Química* 2005; 30(3) 29-35.
- 37 Slosarczyk A, Paszkiewicz Z, Paluszkiewicz C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *Journal of Molecular Structure* 2005;744–747, 657–661.
- 38 Narasaraju TSB, Phebe DE. Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite.

Journal Of Materials Science.1996; 31:1-21.

- 39 Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W. Comparison of *in vivo* dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics, *Biomaterials* 2003;24, 4609–4620.
- 40 Araújo TS, Santos-Filho JB. Hidroxiapatita pura e dopada com Cr³⁺⁺: produção, propriedades e aplicação em biossensores. 1. ed. Aracaju: [s.n], 2008; 2, 13-16.
- 41 Hao Y, Yan H, Wang X, et. al., Evaluation of osteoinduction and proliferation on nano-Sr-HAP: A novel orthopaedic biomaterial for bone tissue regeneration, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2012;12, 207-212.
- 42 Valiense H, et al. In vitro and in vivo evaluation of strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite/sodium alginate for sinus lift in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 2015; 104(2), 274-282.
- 43 Carmo ABXD, Sartoretto SC, Alves ATNN, Granjeiro JM, Miguel FB, Calasans-Maia J, et al. Alveolar bone repair with strontium containing nanostructured carbonated hydroxyapatite. *J Appl Oral Sci* 2018; 26.
- 44 Guo D, Xu K, Zhao X. Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement. *Biomaterials* 2005;26, 4073–4083.
- 45 Guo DG, Hao YZ, Li HY, Fang CQ, Sun LJ, Zhu H, Wang J, Huang XF, Ni PF, Xu KW. 2013. Influences of Sr dose on the crystal structure parameters and Sr distributions of Sr-incorporated hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res Part B* 2013:101B:1275–1283.
- 46 Percival M. Bone health & Osteoporosis, *Appl. Nutr. Sci. Rep.* 1999;5, 1-6.
- 47 Costa NM F, et. Al. Osteogenic effect of tricalcium phosphate substituted by magnesium associated with Genderm® membrane in rat calvarial defect model. *Materials Science and Engineering: C*, 2016;61, 63–71. doi:10.1016/j.msec.2016.
- 48 Bigi A, Foresti R, Gregoriani R, et. al. The role of magnesium on the structure of biological apatites, *Calcif. Tissue Int.* 1992; 50, 439-444.
- 49 Yi C. et. al. Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings: the effect of magnesium incorporation. *Biomed Mater.* 2010 Oct;5(5):054114.
- 50 Cruz R, Calasans-Maia J, Sartoretto S, Moraschini V, Rossi AM, Louro RS et al. Does the incorporation of zinc into calcium phosphate improve bone repair? A systematic review. *Ceramics Inter* 2018; 44:1240-1249.
- 51 Ribeiro et. Al. In vivo evaluation of Zinc-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite. *Trans Tech Publications, Switzerland.* 2016; 696, 223-229.

- 52 Zhao SF. Effects of zinc-substituted nano-hydroxyapatite coatings on bone integration with implant surfaces. *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.* 2013; 14, 518-25.
- 53 Zuo KH, Zeng YP, Jiang D. Synthesis and magnetic property of irons-doped hydroxyapatite, *J. Nanosci. Nanotechnol* 2012; 12: 7096–7100.
- 54 Pon-On W, Meejoo S, Tang M. Incorporation of iron into nano hydroxyapatite particles synthesized by the microwave proces, *Int. J. Nanosci.* 2007;06, 9–16.
- 55 Mayer I, Cuisinier FJG, Popov I, Schleich Y, Gdalya S, Burghaus O, Reinen D. Phase relations between β -tricalcium phosphate and hydroxyapatite with manganese(II): structural and spectroscopic properties. *Eur J Inorg Chem* 2006;7:1460–1465.
- 56 Michal W, Ewa D, Tomas C. Lecithin-based Wet Chemical Precipitation of Hydroxyapatite Nanoparticles, *Colloid Polym Sci.* 2015; 293(5): 1561–1568.
- 57 Chandran S, Babu S S, Vs HK, Varma HK, John A. Osteogenic efficacy of strontium hydroxyapatite micro-granules in osteoporotic rat model. *J Biomater Appl.* 2016;31(4):499–509. doi:10.1177/0885328216647197.
- 58 Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *British Journal of Pharmacology* 2010, 160, 1577–1579.
- 59 Smith AJ, Clutton RE, Lilley E, Hansen KEA, Brattelid T. PREPARE: Guidelines for planning animal research and testing. *Laboratory Animals* 2018; 52, 135–141.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Tabelas Complementares

Tabela complementar 1. Avaliação semiquantitativa 1 semana após o implante. Todos os dados coletados da avaliação semi-quantitativa foram utilizados para avaliar a reação tecidual e a biocompatibilidade, conforme destacado na ISO 10993-6. Os valores para cada animal são uma mediana de 5 seções avaliadas por animal.

1 week	SHAM					CHA					CHAMetals				
Animals	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Polymorphonuclear	2	3	2	2	3	2	3	2	3	2	2	3	2	3	2
Lymphocytes	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Plasma Cells	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
Macrophages	2	1	1	2	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2
Giant Cells	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	1	2	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Score from inflammatory cells SUBTOTAL (X 2)	10	8	6	8	10	10	18	10	8	6	8	10	10	18	10
Neovascularization	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fatty infiltrate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total from tissue response	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	10	8	6	8	10	10	18	10	8	6	8	10	10	18	10
AVERAGE	8.4					15.2					24.6				
RESULT (Test - Control)	---					6.8					16.2				

Tabela suplementar 2. Avaliação semiquantitativa 3 semanas após o implante. Todos os dados coletados da avaliação semi-quantitativa foram utilizados para avaliar a reação tecidual e a biocompatibilidade, conforme destacado na ISO 10993-6. Os valores para cada animal são uma mediana de 5 seções avaliadas por animal

3 weeks	SHAM					CHA					CHAMetals				
Animals	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Polymorphonuclear	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
Lymphocytes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plasma Cells	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Macrophages	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	1
Giant Cells	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2	2	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Score from inflammatory cells SUBTOTAL (X 2)	6	4	6	6	10	12	14	6	4	6	6	10	12	14	6
Neovascularization	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fatty infiltrate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total from tissue response	6	4	6	6	10	0	0	6	4	6	6	10	0	0	6
TOTAL	6	4	6	6	10	12	14	6	4	6	6	10	12	14	6
AVERAGE	6.4					12					23.2				
RESULT (Test - Control)	-----					5.6					16.8				

Tabela complementar 3. Avaliação semiquantitativa 9 semanas após o implante. Todos os dados coletados da avaliação semi-quantitativa foram utilizados para avaliar a reação tecidual e a biocompatibilidade, conforme destacado na ISO 10993-6. Os valores para cada animal são uma mediana de 5 seções avaliadas por animal.

9 weeks	SHAM					CHA					CHAMetals				
Animals	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Polymorphonuclear	2	2	2	1	2	2	2	2	2	3	0	0	0	0	0
Lymphocytes	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	2	2	2
Plasma Cells	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Macrophages	1	1	0	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	3
Giant Cells	0	0	0	0	0	1	2	1	2	2	2	3	2	3	2
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Score from inflammatory cells SUBTOTAL (X 2)	6	6	4	4	6	10	12	12	10	14	14	16	14	16	16
Neovascularization	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1
Fibrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fatty infiltrate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total from tissue response	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1
TOTAL	6	6	4	4	6	10	12	12	10	14	15	17	16	18	17
AVERAGE	5.2					11.6					16.6				
RESULT (Test - Control)	-----					6.4					11.4				