

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

ANDRÉA FERNANDA LOPES DOS SANTOS

COMPÓSITO DE NANOMATERIAIS PARA ENXERTO ÓSSEO

São José dos Campos, SP

2021

ANDRÉA FERNANDA LOPES DOS SANTOS

COMPÓSITO DE NANOMATERIAIS PARA ENXERTO ÓSSEO

Tese de doutorado a ser defendida no programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de doutor em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero

Coorientadora: Prof^a. Dra. Ivone Regina de Oliveira

São José dos Campos, SP

2021

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Santos, Andréa Fernanda Lopes dos
Compósito de nanomateriais para enxerto ósseo / Andréa
Fernanda Lopes dos Santos; orientador, Prof. Dr. Leandro José
Raniero; co-orientadora Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira. -
São José dos Campos, SP, 2021.
1 CD-ROM, 72 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José
dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

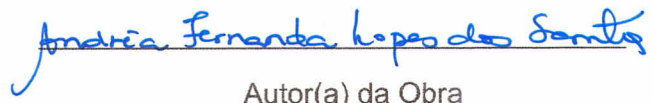
1. Engenharia Biomédica. 2. Nanomateriais. 3. Aluminato de
cálcio. 4. Regeneração Óssea. I. Raniero, Prof. Dr. Leandro José,
orient. II. Oliveira, Profa. Dra. Ivone Regina de, co-orient.
III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Andréa Fernanda Lopes dos Santos, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 28 de Julho de 2021.


Autor(a) da Obra

Data da defesa: 06 / 05 / 2021

ANDRÉA FERNANDA LOPES DOS SANTOS

“COMPÓSITO DE NANOMATERIAIS PARA ENXERTO ÓSSEO.”

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^ª DR.^ª MAIARA LIMA CASTILHO Maiara Lima Castilho
PROF. DR. LEANDRO JOSÉ RANIERO Leandro José Raniero
PROF.^ª DR.^ª IVONE REGINA DE OLIVEIRA Ivone Regina de Oliveira
PROF.^ª DR.^ª LUANA MAROTTA REIS VASCONCELOS - UNESP Luana Marotta Reis Vasconcelos
PROF.^ª DR.^ª ANDREA SANTOS LIU – Instituto Federal SP/SJC Andrea Santos Liu

Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 06 de maio de 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais, Afonso e Irismar.

AGRADECIMENTOS

Ao término de uma intensa jornada como esta, há muitos a quem agradecer. Pessoas que, de diversas maneiras, deram seu carinho, atenção e contribuição para que este trabalho pudesse ser construído. A todos, meu muito obrigado.

A Deus, criador de toda a sabedoria que ilumina todos os passos humanos e os descobrimentos da ciência, pois só Ele tem a ciência da vida.

Esta seção de agradecimentos nos leva a refletir sobre a dimensão dessa trajetória, que inclui a satisfação da aprovação nesta pós-graduação e tantos momentos de desafios, incertezas e fragilidades no caminho do doutorando. A distância física e o desconforto para um novo nos transformam; digo, porque sem o apoio, as exigências e a postura do meu orientador Leandro José Raniero eu não conseguiria concluir este curso. Meu orientador de longe, é um ser humano generoso, empático e um cientista extremamente competente. Minha eterna gratidão e admiração.

À minha co-orientadora Ivone Regina Oliveira e a professora Luana Marotta Reis de Vasconcellos, com suas características tão dinâmicas e apaixonadas pela Ciência me acolheram em seus laboratórios além de incentivo e troca de ideias no exame de qualificação. Meu muito obrigada à professora Maiara Castilho pelo apoio nos artigos da pesquisa, bem como as considerações na banca de qualificação e de defesa deste doutorado. Também às professoras da banca de defesa Maria Zelia Madeira e Andrea Liu pelas contribuições deste trabalho e a colega Juliani Ribeiro pela participação nos experimentos *in vivo*.

A Nathanne Rost, colega do Laboratório de Nanossensores que me apresentou o laboratório com sua inteligência e entusiasmo, um afetuoso abraço para todos os colegas que embora tenhamos convivido fisicamente por pouco tempo, sempre me acolheram com alegria e gentileza: Viviane, Thais, Paula, Ingrid, Vitor, Marcela e Olavo.

Aos meus familiares sempre dando apoio e incentivo; minha mãe por acreditar nos meus esforços e trabalho exaustivo. Eterna gratidão, amor e saudade do meu pai e minha tia Irene Milhomem, que desencarnaram durante este curso, mas que continuam vivos em mim e a certeza da presença espiritual.

À minha turma de viagem para São José dos Campos; Cecilia, Juliana, Karla Joelma, Helton, Olivia e Samara por compartilharmos aprendizado, dúvidas e o bom humor tão necessário para a produção intelectual.

Ao Centro Universitário Uninovafapi e meus colegas do curso de Nutrição, Enfermagem e Comitê de Ética em Pesquisa pela oportunidade de aprender e ensinar, pelas trocas e incentivos durante esta jornada.

A paciência e apoio da Ana Raquel Batista pela formatação do trabalho e Conceição Vaz pelo apoio durante a execução desse trabalho.

A turma da torcida, das alegrias e da solidariedade de sempre; Andréia Marcia, Rosário, Petras, Zélia, Edna, Sany, Rose, Deusa, Maria de Deus e Lourdinha; minha gratidão e lealdade.

Ao Dr Alvaro Regino, amigo e parceiro de anos de trabalho; obrigada pelos conselhos, incentivo e por aprender todos os dias. Minha gratidão e admiração.

Por fim, agradeço a todos aqueles com os quais efetuei trocas em uma trajetória construída passo a passo, entre idas e vindas, desfechos e retomadas que me proporcionou amadurecimento profissional e pessoal. A estes vários parceiros, muito obrigada. Sinto-me honrada e tão pequena diante da grandeza das oportunidades e de aprendizado no mais amplo sentido.

Prece, trabalho e amor constituem a
receita exata para que a luz do teu
espírito se espalhe iluminando teus
passos.
(Irmã Scheilla)

RESUMO

Pesquisas tem sido desenvolvida na área de engenharia biomédica com objetivo de sintetizar um biomaterial satisfatório para favorecer o reparo ósseo. O cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CACH) é um biomaterial extensamente utilizado devido as suas propriedades mecânicas, físicas e de biocompatibilidade devido às suas características particulares como composição semelhante ao corpo humano, alta biocompatibilidade além de promover osteointegração e osteocondução. Porém, a nanotecnologia aplicada em materiais pode promover avanços científicos, proporcionando aplicações associadas a benefícios que levem ao aumento da qualidade de vida, destacando-se o uso de nanopartículas devido a sua versatilidade na área biomédica. O objetivo desta tese foi produzir e caracterizar nanocompósitos à base de CACH associado a nanopartículas de ouro (CACH+AuNPs) e prata (CACH+AgNPs), visando a aplicação no reparo ósseo. As amostras dos nanocompósitos foram avaliadas quanto as suas propriedades mecânicas, determinando a densidade real, resistência à compressão uniaxial, a resistência mecânica à flexão, microdureza e a distribuição do tamanho de poros, como também morfologia e a bioatividade dos nanocompósitos. Os resultados apontaram um aumento da resistência mecânica à flexão para CACH+AuNPs quando comparado ao CACH, e ambos os nanocompósitos apresentaram bioatividade adequada. As citotoxicidade dos nanocompósitos em relação ao CACH também foram avaliadas, por meio das alterações das atividades mitocondrial testadas em cultura de células da linhagem MG-63. Os resultados promissores dos testes *in vitro* levou a aplicação *in vivo*, quando a neoformação óssea foi quantificada por meio de testes em 16 ratos Wistar, os defeitos localizados no fêmur dos animais foram preenchidos com CACH e os nanocompósitos, sendo a referência o defeito com coágulo. O estudo mostrou que não houve benefício na associação do CACH às AgNPs quando comparado ao CACH. Os resultados apontam que o nanocompósito CACH+AuNPs tem potencial de aplicação clínica, melhorando o desempenho do material e aumentando a biocompatibilidade, sendo promissor no tratamento visando o reparo ósseo.

Palavras-chave: Nanomateriais, Cimento de aluminato de cálcio, Reparação óssea.

ABSTRACT

Research has been carried out in the field of biomedical engineering with the aim of synthesizing a satisfactory biomaterial to favor bone repair. Calcium aluminate cement (CAC) is a biomaterial widely used due to its mechanical, physical properties and high biocompatibility. In addition to its characteristics, as a composition similar to human body, it promotes osteointegration and osteoconduction. Nanotechnology has enabled progressive improvement in the scientific field, helping in diagnosis and treatment in various situations, with emphasis on the use of nanoparticles due to their versatility in the biomedical area. The objective of the study was to produce and characterize nanocomposites based on calcium aluminate cement associated with nanoparticles of gold (AuNPs) and silver (AgNPs) aiming at the application in bone repair and subsequently analyzing the mechanical resistance and biocompatibility of the material. *In vitro* and *in vivo* tests were performed. The samples were prepared from CAC with AuNPs and AgNPs and were evaluated for mechanical strength including flexural tension, microhardness, porosity, injectability, viscosity and bioactivity in Simulated Body Fluid (SBF). Cell culture was performed to measure mitochondrial activity and bone neoformation was analyzed in 16 male Wistar rats. Mechanical tests showed that the addition of gold nanoparticles increased the bending stress and decreased porosity and pore diameter. Bioactivity was increased and injectability was effective, making it possible to adapt to the geometry of the bone defect. *In vitro* tests showed mitochondrial activity for CACH, CACH + AuNPs and CACH + AgNPs. *In vivo* analysis showed new bone formation with higher averages than the control groups, suggesting a positive result for the composite CACH + AuNPs. As for CACH + AgNPs, it was not shown to be superior in mechanical properties or bone neoformation. The results show that the CACH + AuNPs nanocomposite has potential for clinical application, improving the performance of the material and increasing biocompatibility, which is promising in the treatment aimed at bone repair.

Keywords: Nanomaterials, Calcium aluminate cement, Bone repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos tecidos ósseos compacto e esponjoso.....	21
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura de um osso longo: a) secção transversal do osso; b) magnificação da secção; c) magnificação do osso esponjoso; c) magnificação da estrutura do osso esponjoso.	23
Figura 3 - Representação de fraturas fechada e exposta.....	25
Figura 4 - Variação dos tipos de fraturas demonstradas em osso longo.	26
Figura 5 - Etapas de reparo indireto de uma fratura óssea.	27
Figura 6 - Síntese de Nanopartículas.	37
Figura 7 - Imagens do procedimento cirúrgico: a) procedimento do defeito ósseo; b) defeito finalizado; c) cimento injetado no orifício; c) procedimento cirúrgico finalizado.	45
Figura 8 - Nanopartículas de Ouro e Prata: a) Espectro UV-Visível e b) Diâmetro hidrodinâmico.	49
Figura 9 - Propriedades mecânicas das amostras e CACH, CACH+ AuNPs and CACH+ AgNPs: a) Densidade real; b) Resistência à compressão uniaxial; c) Resistência mecânica à flexão; d) Microdureza.	51
Figura 10 - Distribuição de tamanho de poros, tamanho médio de poro e porosidade antes e após tratamento com SBF por sete dias das amostras CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs. Porosidade aparente para as amostras CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs.	53
Figura 11 - Análises por microscopia eletrônica de varredura da superfície das amostras CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs antes e após contato com solução SBF por 7, 14 e 21 dias. Análises por microscopia eletrônica de varredura da superfície das amostras CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs.	54
Figura 12 - Imagens para injetabilidade manual para suspensões aquosas de CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs com teor de sólidos de 76 e 78% em peso, usando agulha hipodérmica. Ensaio reológico oscilatório (G' e G'') a 37°C em função da frequência para suspensões.	56
Figura 13 - Análises por microscopia eletrônica de varredura da superfície das amostras CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs em contato com cultura celular por 24, 72 e 120 dias.	57
Figura 14 - Atividade mitocondrial da linhagem MG-63 após aplicação do CACH.	58

Figura 15 - Análise histológica: a) Quantificação da área óssea neoformada; b) grupo controle; b) grupo CACH; c) grupo CACH + AgNPs e; d) Grupo CACH + AuNPs. A seta vermelha indica regiões de neoformação no tecido ósseo.	59
Figura 16 - Análise ANOVA combinada com teste Dunnett, neoformação nos grupos.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes usados na preparação de um litro de solução de fluido corporal simulado de acordo com Rigo.....	40
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs	Nanopartículas de Prata
AuNPs	Nanopartículas se Ouro
ATM	Agregado Trióxido Mineral
CAC	Cimento de Aluminato de Cálcio
CACH	Cimento de Aluminato de Cálcio Homogêneo
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz, do inglês Dynamic Light Scattering
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i>
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTH	Parathyroid Hormone - hormônio da paratireide
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do RANK

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivo Geral	17
1.2 Objetivos Específicos.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Tecido Ósseo	18
2.1.1 Estrutura e metabolismo ósseo.....	18
2.1.2 Propriedades Biomecânicas	23
2.1.3 Fraturas ósseas	24
2.1.4 Reparo e remodelação óssea.....	26
2.2 Biomateriais	30
2.2.1 Cimento de Aluminato de Cálcio	31
2.3 Nanotecnologia e aplicações biomédicas.....	32
2.3.1 Nanopartículas de Ouro	34
2.3.2 Nanopartículas de Prata	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Síntese de nanopartículas.....	37
3.2 Caracterização das nanopartículas	38
3.2.1 Espectroscopia UV-Visível.....	38
3.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz	38
3.2.3 Diâmetro Hidrodinâmico	39
3.3 Síntese do Nanocompósitos	39
3.3.1 Análise de biocompatibilidade.....	39
3.4 Caracterização Estrutural dos Nanocompósitos.....	40
3.4.1 Densidade real das amostras.....	40
3.4.2 Resistência mecânica à compressão uniaxial, porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros.....	40
3.4.3 Resistência mecânica à flexão 3 pontos	42
3.4.4 Dureza.....	42
3.5 Aplicações dos Nanocompósitos - Ensaios <i>in vitro</i>	43
3.5.1 Cultura Celular	43
3.5.2 Avaliação da Atividade Mitocondrial	43
3.6 Aplicações dos Nanocompósitos - Ensaios <i>in vivo</i>	44
3.6.1 Análise Histológica.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
4.1 Nanopartículas de Ouro e Prata.....	48
4.2 Nanocompósitos de Ouro e Prata	50
4.3 Nanocompósitos testes <i>in vitro</i>	56

4.4 Nanocompósitos testes <i>in vivo</i>	59
5 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Entre as causas mais frequentes de lesões com fratura estão os acidentes de trânsito, que é um problema mundial, resultando em prejuízos econômicos para as vítimas, famílias e para a economia em geral (VASCONCELOS et al., 2013; MORADI, 2017). Esses eventos são responsáveis por até 13% de todas as injúrias ósseas e projeções globais de mortalidade por ocorrências de trânsito indicam aumento para 2,1 milhões em 2030. (MATHERS et al, 2006, RAZZAGHI et al, 2013).

A arquitetura óssea possui grande capacidade regenerativa, que pode ser dividida em três fases: inflamatória, reparadora e remodeladora (BÃO et al., 2017). Entretanto quando comprometida por determinadas lesões, cerca de 10% dos casos de injúria podem evoluir para complicações na consolidação óssea e/ou até mesmo desenvolver uma condição denominada de pseudoartrose (HENKEL et al., 2013).

Neste contexto, pesquisa vem sendo desenvolvidas na área da engenharia biomédica em busca de materiais que favoreçam a reparação óssea após lesões ósseas ou em casos de injúrias decorrentes das pseudoartroses (OLIVEIRA et al., 2013; CASTRO-RAUCCI et al., 2016; CARMO et al., 2017). Os biomateriais têm sido utilizados em aplicações biomédicas em virtude da biocompatibilidade, pois apresentam características similares ao tecido do evitando a indução da resposta tecidual ou imunológica adversa.

O aluminato de cálcio Homogêneo (CACH) é atualmente o biomaterial mais utilizado para acelerar o processo de cicatrização óssea, pois estudos científicos evidenciaram a eficiência de formulação à base deste cimento em várias aplicações da ortopedia e odontologia (OLIVEIRA et al., 2013; POMPEU et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; CASTRO-RUCCI et al., 2016; CARMO et al., 2017). Entre as vantagens do CAC para aplicações biomédicas estão o menor tempo de endurecimento, maior resistência mecânica, melhor desempenho como componente de preenchimento ósseo, superando as desvantagens dos compostos à base de silicato de cálcio e do agregado trióxido mineral (ATM), tais como: longo tempo de endurecimento, alta porosidade e baixa resistência mecânica (OLIVEIRA et al., 2017; PARREIRA 2016).

Na última década, as pesquisas vinculadas a nanotecnologia vêm ganhando grande repercussão, principalmente em virtude que a miniaturização de estrutura em dimensões manométricas, que passam a ter propriedades físicas, químicas ou biológicas diferentes de uma estrutura com dimensões macroscópicas (BAPTISTA et

al., 2008; CHEN; SCHLUESENER, 2008; MELO JR; et al., 2012; PARREIRA, 2016; VIEIRA et al., 2017). Então, pode-se afirmar, que estes materiais podem promover avanços científicos, proporcionando aplicações associadas a benefícios que levem ao aumento da qualidade de vida, por exemplo, no âmbito desta tese, melhorar a biocompatibilidade do CACH, principalmente no quesito do aumento da velocidade da regeneração óssea, por meio da ativação de cascatas de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que levam a recuperação mais rápida de pacientes. (LI et al., 2020; Assim, o CACH foi associado a nanopartículas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs), as propriedades mecânicas foram caracterizadas e comparadas com o padrão CACH. Os detalhamentos serão feitos no decorrer desta tese.

1.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar as nanocompósitos a base de Cimento de Aluminato de Cálcio Homogêneo associado a nanopartículas de ouro e nanopartículas de prata visando a aplicação no reparo ósseo, no que diz respeito a resistência mecânica e biocompatibilidade.

1.2 Objetivos Específicos

- Realizar a síntese e caracterização das nanopartículas de ouro e prata.
- Realizar a síntese dos nanocompósitos à base de nanopartículas de ouro e prata e cimento de aluminato de cálcio.
- Analisar as propriedades físicas, morfológicas e biológicas dos nanocompósitos.
- Avaliar a biocompatibilidade do nanocompósito em testes *in vivo* e *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo foi descrito o estado da arte dos tópicos importantes abordados neste trabalho, realizando uma estrutura conceitual sobre o tecido ósseo, o biomaterial para reparo deste tecido e a nanotecnologia.

2.1 Tecido Ósseo

Os próximos tópicos abordam sobre papel importante no suporte, estruturação, proteção e locomoção e metabolismo óssea.

2.1.1 Estrutura e metabolismo ósseo

O sistema esquelético é responsável pela sustentação e modelação do corpo, além da proteção de tecidos moles e órgãos vitais e realização de movimentos. Para isso, o principal constituinte deste sistema, o tecido ósseo, possui estrutura complexa para desempenhar tais funções de modo correto, em ausência de complicações e patologias (ANDIA et al., 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; GILROY, 2015; CAETANO, 2017).

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, composto por células e uma matriz óssea. As células deste tecido são responsáveis pela síntese e reabsorção da parte orgânica da matriz e do próprio tecido, enquanto a matriz óssea é composta de material extracelular calcificado. As células do tecido ósseo são responsáveis pelos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea. Estas são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos(ANDIA et al., 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; CAETANO, 2017).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese e mineralização da parte orgânica da matriz óssea, portanto, se localizam nas superfícies ósseas, dispondo-se lado a lado em um arranjo simples sobre o osteóide, ou seja, a superfície em formação. Morfologicamente, se apresentam como células mononucleadas de origem mesenquimal e núcleo esférico. A intensa atividade sintética dos osteoblastos torna-os cuboides, entretanto, quando estão em estado pouco ativo, tornam-se ligeiramente alongados e achatados (ANDIA et al., 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; CAETANO, 2017).

Na síntese do tecido ósseo, os osteoblastos secretam matriz orgânica e então, a mineralizam. Estas células exibem níveis elevados de fosfatase alcalina, enzima que contribui para a mineralização da matriz e na formação de cristais de hidroxiapatita. Quando estes estão adjacentes à matriz orgânica recém-sintetizada, pequenas vesículas são desenvolvidas pela superfície, desprendendo-se dos osteoblastos. As vesículas da matriz, como são denominadas, contêm glicoproteínas em seu interior e fosfatase alcalina na membrana, que hidrolisa os íons fosfato internalizando-os para a vesícula. Após este processo, ocorre uma supersaturação de fosfato e cálcio no interior destas que, quando rompidas, espalham a precipitação de fosfato de cálcio formado pela matriz (ANDIA et al., 2006; AKERS; DENBOW, 2008).

Quando sofrem mudanças morfológicas e funcionais que culminam com a diminuição de secreção de proteínas, os osteoblastos são transicionados para células de revestimento ósseo, representando o fenótipo final da linhagem osteoblástica. Nesta fase, estas células recobrem as superfícies quiescentes e formam uma camada de células interconectadas com a função homeostática, regulando a concentração plasmática de cálcio, além de estarem associadas ao remodelamento ósseo. Na deposição da matriz ao redor do corpo das células e prolongamentos, são formados as lacunas e os canalículos, portanto, quando aprisionados, os osteoblastos tornam-se osteócitos (ANDIA et al., 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; CAETANO, 2017).

Os osteócitos são células de morfologia elíptica, achatada e possuem poucas organelas de síntese e secreção, indicando atividade metabólica pobre, entretanto, indispensável para a manutenção da homeostase óssea. Estes são encontrados aprisionados no interior da matriz óssea, sendo um por lacuna, com seus diversos prolongamentos situados no interior de canalículos. Os prolongamentos estabelecem junções comunicantes tipo gap entre os osteócitos a outros osteócitos adjacentes e osteoblastos, por onde passam pequenas moléculas e íons, permitindo que todos possam responder às modificações sistêmicas e superficiais. Dessa forma, os canalículos constituem uma rede responsável pela manutenção e vitalidade da matriz, portanto, considerados essenciais para a manutenção óssea, dado que a apoptose dos osteócitos atrai e estimula a atividade de osteoclastos (ANDIA et al., 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; CAETANO, 2017).

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, que possuem áreas específicas com porções dilatadas, depositadas em depressões escavadas pela atividade dessas células, conhecidas como lacunas de Howship. Além da função principal de promoção de desmineralização e degradação da matriz óssea, os osteoclastos podem internalizar também os osteócitos da reabsorção óssea e como são células móveis, tem a migração estimulada pelos osteoblastos em apoptose para os sítios a serem reabsorvidos, que então reconhecem estes e internalizam essas células apoptóticas, sendo assim, o processo é auto-regulável, ou seja, é dependente da necessidade do tecido, devido também à dissolução mineral que precede a degradação da matriz, promovendo a migração deste tipo celular pelo tecido (ANDIA et al., 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Morfologicamente, os osteoclastos são células gigantes e multinucleadas, devido à sua formação pela fusão de precursores mononucleados provindos da medula óssea quando em contato com o tecido ósseo. A superfície ativa destes possui prolongamentos vilosos, adjacente à superfície óssea, formando uma borda em escova e em sua periferia, há uma região citoplasmática apoiada na matriz óssea como um local de adesão, denominado zona clara (ANDIA et al., 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; CAETANO, 2017).

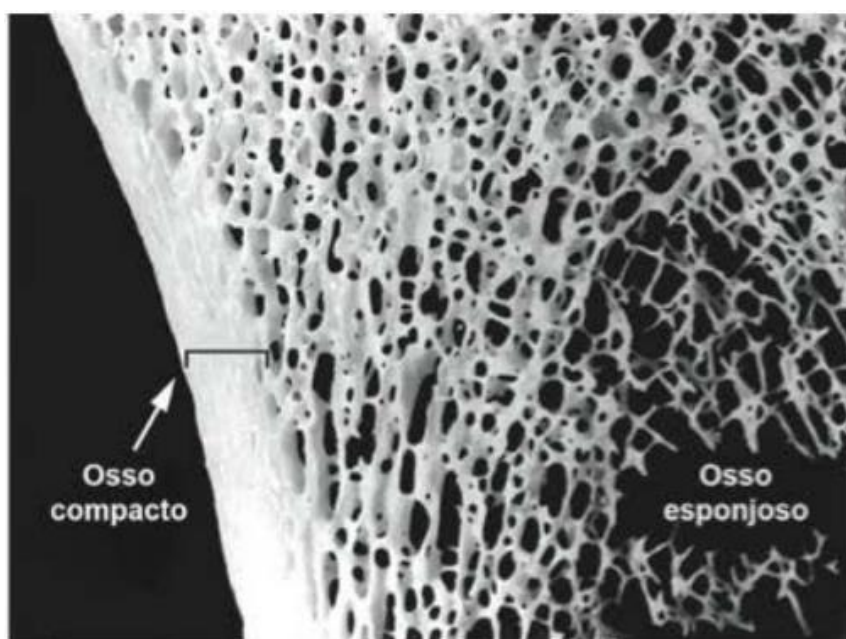
A zona clara é rica em actina e miosina e engloba o microambiente de reabsorção óssea, pois é o local onde ocorre a desmineralização e degradação da matriz tecidual. Durante o processo de desmineralização e degradação, os osteoclastos secretam ácido e enzimas proteolíticas para dentro da zona clara, que atuam localmente na digestão da matriz orgânica e dissolução dos cristais de sais de cálcio (ANDIA et al., 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; CAETANO, 2017).

A matriz óssea, ou matriz extracelular mineralizada, é composta pela parte orgânica, correspondente de 25 a 30%, e parte inorgânica de 65 a 70%. A parte orgânica compreende majoritariamente fibras colágenas, constituídas de colágeno tipo I, além de proteoglicanos e glicoproteínas, que tem participação na mineralização da matriz. Esta contém, em pequenas quantidades, fosfoproteínas, citocinas, osteocalcinas (estimulante da atividade dos osteoblastos) e osteonectinas (facilitador da deposição de cálcio), que, durante a síntese da matriz orgânica realizada pelos osteoblastos, são capazes de formar um arcabouço, permitindo a

deposição de sais minerais. Já na parte inorgânica, os íons de maior constituição são o fosfato e cálcio, entretanto, também são encontrados bicarbonato, citrato, potássio, magnésio e sódio (ANDIA et al., 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; CAETANO, 2017).

Para além das funções de sustentação, proteção e locomoção, o osso configura a maior reserva de cálcio do organismo, aloja a medula óssea e proporciona apoio aos músculos esqueléticos. Para isso, é analisada uma estrutura macroscópica e microscópica. Dentre a estrutura macroscópica, o osso possui duas formações com mesma constituição, porém, diferentes em estrutura e função. O primeiro é o osso compacto (ou cortical), que não possui cavidades visíveis e sua estrutura é sólida e homogênea. O segundo se denomina osso esponjoso, com muitas cavidades visíveis alojando medula óssea, como apresentado pela figura 1 (AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; CAETANO, 2017).

Figura 1 - Estrutura dos tecidos ósseos compacto e esponjoso.



Fonte: Junqueira; Carneiro, 2013.

Quanto a localização, o tecido ósseo compacto é encontrado em uma delgada camada superficial compacta nas extremidades, ou epífises, assim como na totalidade da diáfise, ou corpo, dos ossos longos. Este também é encontrado na periferia dos ossos curtos, formando uma envolta camada compacta. Os envoltórios

rígidos formados pelo osso compacto caracterizam resistência a deformação(AKERS; DENBOW, 2008; GILROY, 2015; CAETANO, 2017).

O tecido ósseo esponjoso é encontrado na região central dos ossos longos e curtos, inclusive na delimitação do canal medular e nas epífises dos ossos longos. Os trabéculas da matriz óssea do osso esponjoso implicam aspecto poroso ao tecido e são preenchidos pela medula óssea, chamada hematogena quando em recém-nascidos, de coloração vermelha devido à alta porcentagem de hemácias e produção de células do sangue; e a medula óssea amarela, de coloração amarela sendo infiltrada por tecido adiposo com a idade(AKERS; DENBOW, 2008; GILROY, 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; CAETANO, 2017).

Dentre a estrutura microscópica, ou histológica, o tecido ósseo se divide em primário (ou imaturo) e secundário (maduro ou lamelar). Os dois tecidos apresentam os mesmos constituintes, entretanto, o tecido imaturo é temporário, o que indica que é o primeiro tecido a aparecer no desenvolvimento embrionário, assim como no reparo de fraturas, sendo substituído gradativamente pelo tecido maduro. Este possui as fibras colágenas desorganizadas, dispostas em várias direções (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

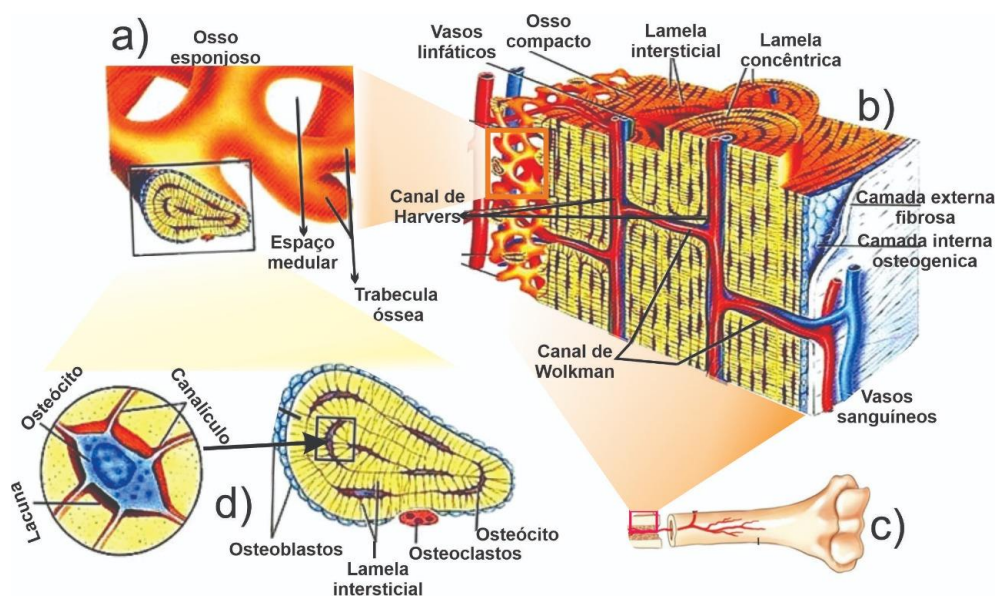
O tecido ósseo maduro possui as fibras colágenas organizadas em faixas paralelas entre si, denominadas lamelas, entre as quais estão situadas as lacunas dos osteócitos, ou concêntricas em torno de canais com vasos, formando o sistema de Havers. Em um grupo de lamelas ocorre, geralmente, o acúmulo de matriz mineralizada em ausência de colágeno, denominada substância cimentante(AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Cada sistema de Havers possui de quatro a vinte lamelas ósseas e no centro, um canal que contém vasos, o canal de Havers, que se comunicam com a cavidade da medula e superfície óssea externa através dos canais de Volkmann, que são oblíquos ou transversais em relação aos canais de Havers, atravessando as lamelas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Nesta estrutura, apresentada pela figura 2, também é citável um revestimento por tecido conjuntivo fino e células osteogênicas, constituindo o endóstio e o perióstio, que nutrem o tecido e fornecem osteoblastos para crescimento ósseo. O endóstio reveste as cavidades do tecido ósseo esponjoso, e os canais medulares, de Havers e de Volkmann. Já o perióstio contém fibras colágenas, denominadas,

neste caso, de fibras de Sharpey, que fixam este fino tecido ao tecido ósseo. (AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura de um osso longo: a) secção transversal do osso; b) magnificação da secção; c) magnificação do osso esponjoso; d) magnificação da estrutura do osso esponjoso.



Fonte: Adaptado de Wers, 2014.

2.1.2 Propriedades Biomecânicas

O tecido ósseo possui grande capacidade de adaptação aos estímulos mecânicos ao longo da vida, associados às atividades fisiológicas. Os estímulos, estáticos ou dinâmicos, são solicitações mecânicas por consequência da gravidade ou atividade muscular, por exemplo. Como forma de resposta a estes estímulos, o osso possui propriedades intrínsecas, como dureza, força e elasticidade (JUDAS et al., 2012; EMI, 2014; GRAÇA, 2018).

A dureza como característica óssea é decorrente da parte inorgânica da matriz extracelular mineralizada, representada principalmente pelos íons como cálcio e fosfato. A agregação de fibras colágenas à hidroxiapatita, formada pelos íons cálcio e fosfato, confere rigidez e resistência ao tecido ósseo. Entretanto, dado a diferença microestrutural entre o osso compacto e o osso esponjoso, que consiste

na deposição das fibras, tamanho das trabéculas e presença dos canais de Havers, o osso compacto possui rigidez e resistência superiores aos do osso esponjoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; EMI, 2014; GRAÇA, 2018).

A parte orgânica da matriz extracelular mineralizada, proporciona resistência mecânica e um certo grau de elasticidade ao osso, pela constituição predominante de colágeno, assim viabiliza inclusive, potencial para suportar as forças de tração (EMI, 2014; CAETANO, 2017).

O osso pode ser definido como um material multifásico poroso, que possui comportamentos anisotrópicos, ou seja, suas propriedades mecânicas não atuam da mesma forma em todas as direções, portanto, este é mais resistente na orientação longitudinal, dado a posição dos canais de Havers ao longo do eixo ósseo (GRAÇA, 2018).

Devido às suas propriedades mecânicas intrínsecas, proporcionadas pela composição orgânica e inorgânica, além do microambiente estruturado, os ossos podem suportar certo grau de compressão e tração sem que ocorra fraturas, visto que a resistência à tração é menor do que a resistência à compressão. Entretanto, quando a força de resistência é excedida, seja por fragilidade óssea natural ou adquirida, ou por grande impacto, a fratura ou lesão traumática ocorre, causando a perda da integridade esquelética (EMI, 2014; LANDUCI, 2016; GRAÇA, 2018; CAETANO, 2017).

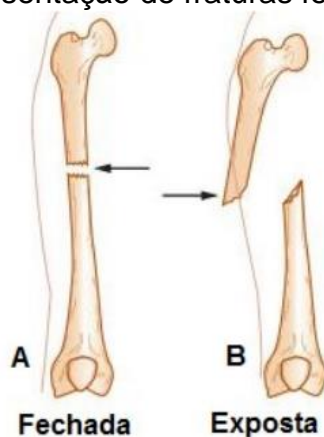
2.1.3 Fraturas ósseas

As fraturas ósseas são lesões traumáticas, resultadas de uma carga de grande magnitude sobre o osso, por meio das forças de tensão, cisalhamento, compressão, curvamento ou torção, que podem atuar em conjunto ou individualmente. Do ponto de vista mecânico, as fraturas representam a perda da capacidade do osso de suportar a carga durante a execução do movimento, cuja causa é a perda da integridade da estrutura esquelética ou uma carga superior à suportada (SIZÍNIO et al., 1998; HAMILL; KNUTZEN, 2008).

As fraturas são classificadas em um grupo geral, quanto ao traço e a exposição. Em relação ao traço, as fraturas podem ser incompletas, quando ocorre um rompimento parcial do osso, ou completa, com perda da continuidade óssea. Em relação à exposição, como apresentado pela figura 3, estas podem ser fechadas,

quando as partes ósseas permanecem dentro do corpo; ou exposta, quando parte óssea é projetada para fora do corpo (FILHO; MIBIELLI; SILOS, 2018).

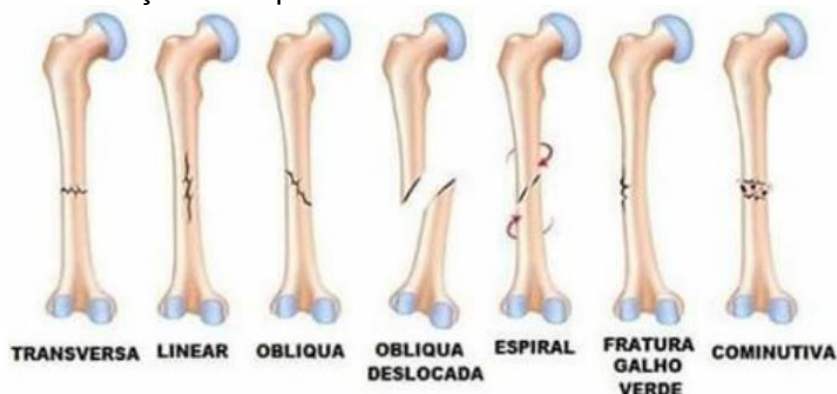
Figura 3- Representação de fraturas fechada e exposta.



Fonte: Machado et al., 2017.

Outra classificação mais específica das fraturas, apresentada pela figura 4, são em relação à posição desta no osso, o que inclui a fratura transversa, quando o traço de fratura atravessa o osso numa linha aproximadamente perpendicular à diáfise; fratura linear, quando o traço da fratura é paralelo à diáfise, no eixo; fratura oblíqua, quando a fratura é diagonalizada em relação ao eixo do osso, no qual, esta pode ser ou não deslocada; fratura espiral, quando a fratura se encontra ao redor e transversa ao eixo ósseo; fratura em galho verde, quando o perióstio permanece intacto e mantém no lugar as extremidades do osso; e fratura cominutiva, quando existem muitas partes fraturadas. Além dos exemplos citados, há ainda a fratura patológica, que ocorre devido ao sofrimento ósseo à debilitação precedente por alguma moléstia, como a distrofia fibrosa ou tumores ósseos (MACHADO et al., 2017)

Figura 4 - Variação dos tipos de fraturas demonstradas em osso longo.



Fonte: Machado et al., 2017.

O reparo das fraturas envolve eventos inflamatórios e reparatórios para atingir a remodelação óssea, assim como as ossificações intramembranas e endocondral. (OVALLE; NAHIRNEY, 2014).

2.1.4 Reparo e remodelação óssea

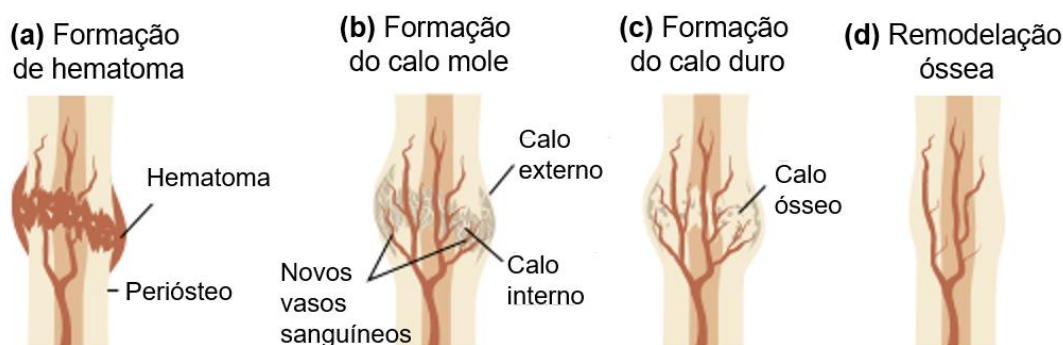
Diante de uma fratura óssea, uma série de eventos para reparação e remodelação óssea, ou consolidação, se iniciam. Esta terá principalmente, a ação dos osteoblastos e osteoclastos, no qual pode ocorrer de duas formas: indireta ou direta (PANSIERI; ESTEVES; JUNIOR, 2019).

A cicatrização indireta se inicia como um processo natural, sem intervenção cirúrgica ou quando essas intervenções visam movimentação no local da fratura, como por exemplo a fixação intramedular, externa ou interna de fraturas cominutivas (GERSTENFELD et al, 2003; GERSTENFELD et al, 2006; PANSIERI; ESTEVES; JUNIOR, 2019; SOARES, 2019).

Este processo de reparo é apresentado pela figura 5, em que a primeira fase indica uma formação do hematoma, com uma resposta inflamatória imediata, no qual as células-tronco mesenquimais utilizadas no processo se diferenciam em condrócitos e osteoblastos, que produzem cartilagens e formam o osso, respectivamente. Em seguida, a segunda fase se inicia na formação de um calo, na produção de uma matriz cartilaginosa mineralizada e a reabsorção desta para a transição óssea, na terceira etapa do processo. Ao final do processo, ocorre a remodelação óssea, em que o calo ósseo é reabsorvido e modificado,

reestruturando a estrutura anatômica que suporta as cargas mecânicas (GERSTENFELD et al, 2003; GERSTENFELD et al, 2006; PANSIERI; ESTEVES; JUNIOR, 2019; SOARES, 2019).

Figura 5 - Etapas de reparo indireto de uma fratura óssea.



Fonte:Carano; Filvaroff, 2003 (adaptado).

A cicatrização direta ocorre quando o processo é realizado com auxílio de intervenções cirúrgicas. Neste caso, não há resposta inflamatória ou formação de calos, como ocorre na cicatrização indireta, sendo assim, o processo se inicia já com a remodelação óssea. Esta possui dois modos de cicatrização, a cicatrização por contato, em que ocorre pelo processo simultâneo da união e remodelação óssea; ou a cicatrização por lacunas, em que os processos são viabilizados sequencialmente (GERSTENFELD et al, 2003; GERSTENFELD et al, 2006; PANSIERI; ESTEVES; JUNIOR, 2019; SOARES, 2019).

O tecido ósseo sofre um processo contínuo de remodelação, em um mecanismo natural de reconstrução das áreas do tecido ósseo de modo a preservar a sua integridade, preservando-o de degradações, assim como no processo final do reparo de fraturas. Essas modificações são realizadas em várias fases, como na transição de um osso primário em maduro, no crescimento e manutenção morfológica, na transição do osso esponjoso para compacto, ou seja, para adaptação nas diversas situações fisiológicas e patológicas, dado a reabsorção e deposição de matriz óssea. (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; HENN, 2010; JUDAS et al., 2012).

Esse processo é iniciado com a ativação dos osteoclastos pela remoção dos osteóides e exposição da matriz mineralizada, ou pela ativação de citocinas. Em

seguida, a formação do osso é dependente da proliferação e migração das células osteoprogenitoras, além da diferenciação dos osteoblastos, controlados por uma cascata de eventos genéticos pela regulação dos genes de fatores locais e sistêmicos. Estes fatores, são os hormônios, citocinas e fatores de crescimento, como o PTH , vitamina D, interleucinas (IL-1, IL-6), TNF- α , RANKL, RANK e osteoprotegerina (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; HENN, 2010; JUDAS et al., 2012; MAZZONETTO; DUQUE NETTO; NASCIMENTO, 2012).

Os fatores supracitados realizam a estimulação de liberação de moléculas pelos osteoblastos a fim da migração e adesão à superfície óssea, para a atividade de produção de matriz óssea e controle dos osteoclastos, sendo assim, um equilíbrio entre a dinâmica dos osteoblastos e osteoclastos, ou seja, formação e reabsorção, é imprescindível para a remodelação óssea. Um desequilíbrio nesta atividade pode ocasionar reabsorções patológicas como artrites ou até mesmo tumores. Outros fatores podem interferir no processo de equilíbrio, como por exemplo: idade, doenças ósteo-metabólicas, mobilidade diminuída e ação de drogas (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; HENN, 2010; JUDAS et al., 2012; MAZZONETTO; NETTO; NASCIMENTO, 2012).

O reparo anatômico e funcional dos ossos pelo organismo, naturalmente, limita-se a situações em que há proximidade entre as extremidades dos ossos. Entretanto, existem danos que levam a perda de uma grande extensão de material e as extremidades não se unem, além da ocorrência de uma depressão na região de união, ou a produção de ossos como em cirurgias de imobilização da coluna pela união dos discos. Em alguns casos, os danos não são recuperados mantendo-se as propriedades e fisionomia dos ossos, neste contexto, os enxertos ósseos e a engenharia de tecidos estão sendo desenvolvidos, visando à reconstrução tecidual em sua estrutura e funcionalidade para regeneração de tecido ósseo através de intervenções cirúrgicas (SILVA et al., 2017; ALMEIDA et al., 2020).

Uma das formas de reparação óssea é a utilização de enxertos, nos casos em que não há recuperação total das propriedades e fisionomia, portanto, a reconstrução tecidual óssea em estrutura e funcionalidade pode ser adquirida nas intervenções cirúrgicas com o desenvolvimento da engenharia de tecidos (SILVA et al., 2017; ALMEIDA et al., 2020).

Entre os tipos de enxerto disponíveis está o autoenxerto, ou enxerto autógeno, quando o tecido é originário do próprio paciente. Neste tipo de

transplante, o risco de contaminação é baixo, bem como há a presença de osteoindução, osteocondução e osteogeneidade, entretanto, os riscos desta técnica incluem um processo pós-operatório demorado e em morbidades. Alguns materiais autógenos geralmente utilizados, são o osso esponjoso do osso ilíaco e tibia proximal ou o aspirado de medula óssea colhido através de punção da crista ilíaca (GUTIERRES et al., 2005; SEBBEN et al., 2012).

O aloenxerto, por sua vez, é proveniente de um doador de mesma espécie e deve ser tratado previamente contra respostas inflamatórias intensas e infecções. O processamento destes materiais envolve congelamento ou liofilização e este pode ser disponibilizado em gel, pó, fibras e pastas (GUTIERRES et al., 2005; MACHADO, 2007).

O xenoenxerto é um material proveniente de outras espécies e necessita de tratamentos contra antígenos, além dos processamentos para deslipidização, desproteínização e adição de células da medula óssea humana (GUTIERRES et al., 2005).

Neste sentido, as células ósseas enxertadas podem ser derivadas do organismo próprio, de organismos de mesma espécie ou de organismos de espécies diferentes. Para a neoformação tecidual, é necessário que o enxerto possua células capazes de se diferenciar em tecido ósseo, um estímulo osteoindutor para que a diferenciação das células ocorra (como a adição de fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras, muito comum em enxertos sintéticos) e um meio osteocondutor para crescimento do tecido (SEBBEN et al., 2012).

Já os enxertos aloplásticos, são substitutos ósseos sintéticos em desenvolvimento na área de biomateriais. Esses possuem a disponibilidade de produção em escala industrial como vantagem, entretanto, exigem tratamentos para aumentar a osteogenicidade e osteocondução. Neste campo, se encontram os materiais cerâmicos como sulfato de cálcio, vidros bioativos e fosfatos de cálcio, como a formação de hidroxiapatita que, como citado nos capítulos 3.1.1 e 3.1.2, fazem parte da matriz óssea na parte inorgânica, portanto, indica alta relevância no reparo ósseo (GUTIERRES et al., 2005; MACHADO, 2007; SEBBEN et al., 2012).

2.2 Biomateriais

Os cimentos como implantes porosos, possuem elevada área superficial, o que permite maior contato entre o organismo e o enxerto. Dessa forma, características como maior resistência do material, imobilidade do implante e resposta inflamatória minimizada, são adquiridas. A porosidade do material é obtida na sintetização deste, durante a eliminação da fase orgânica adicionada ao material (MACHADO, 2007).

Na estratégia de promover interações entre o biomaterial utilizado como enxerto e as células adjacentes formando um tecido, aliado à necessidade de desenvolver matrizes tridimensionais para as células, geralmente provenientes do próprio paciente, a serem cultivadas *in vitro* e recolocá-las no tecido lesionado, como uma estrutura semelhante ao tecido, os *scaffolds*. Estes são, portanto, desenvolvidos pela engenharia de tecidos a fim de atuar no reparo, reconstrução e melhora do desempenho de estruturas teciduais perdidas ou danificadas, tridimensionalmente. Os *scaffolds*, por definição, são arcabouços, como estruturas temporárias para otimização do crescimento e distribuição espacial das células, providenciando suporte mecânico adequado para a regeneração tecidual, através das células proliferativas, de forma organizada em estruturas complexas (WILLIAMS et al., 2005; BARBARISI et al., 2015; DALTRO et al., 2020).

Estes arcabouços possuem controle da microestrutura e topografia celulares, simulando as atividades do tecido em reparo, que possuem técnicas para mimetização da matriz extracelular e podem ser enriquecidos com biomoléculas para a integração do biomaterial com o tecido, como os fatores de crescimento e indutores de diferenciação, interferindo na bioatividade, ou seja, a interação entre material e tecido (WILLIAMS et al., 2005; BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012; BARBARISI et al., 2015).

Segundo Dhandayuthapani et al. (2011), BOSE et al. (2012) e SEO et al. (2014) um *scaffold* ideal deve promover a bioatividade, adesão celular, deposição de matriz extracelular e nutrientes para a proliferação e diferenciação das células, tal como a degradação deste deve se assemelhar às taxas de regeneração tecidual e com os mínimos riscos de inflamação ou toxicidade *in vivo*.

Sendo assim, as características necessárias ao biomaterial são biodegradabilidade, ou capacidade de degradação no organismo;

bioreabsortividade, ou a capacidade dos produtos da biodegradação de eliminação pelas vias metabólicas normais do organismo; compatibilidade mecânica; tamanho de poro adequado, de diâmetros entre 200 a 350 μ m para permitir a vascularização e invasão celular, apesar de reduzir a resistência mecânica, garantindo os processos celulares adequados; e biocompatibilidade, como a capacidade de suportar a atividade celular sem apresentar citotoxicidade, promovendo neoformação óssea e mimetizando o ambiente(BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012; SEO et al., 2014).

Nesse contexto, é necessário o desenvolvimento de um biomaterial com características adequadas para atuar como um scaffold e que possua características de biomimetização do microambiente do tecido ósseo constituído por um compósito cerâmico reforçado.

2.2.1 Cimento de Aluminato de Cálcio

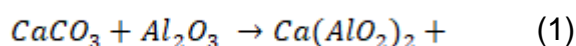
As biocerâmicas são continuamente estudadas para a utilização no corpo humano, principalmente no reparo do sistema esquelético e desenvolvimento de tecidos duros e moles. Os materiais mais utilizados incluem o titânio, hidroxiapatita, alumina, zircônia e porcelana, quando há aplicação no sistema esquelético, formando principalmente cimentos ósseos, cujo uso é diversificado, sendo amplamente utilizado em aplicações como próteses, reparação e preenchimento do tecido em casos de traumas e fraturas relacionados a patologias, acidentes e reestruturação da anatomia óssea (CGEE, 2010; LÖÖF, 2008).

Métodos inovadores estão sendo desenvolvidos para o preenchimento e reconstrução aloplásticos de segmentos ósseos na busca da saúde e qualidade de vida, atendendo às demandas mecânicas e biológicas. Em consequência do surgimento de complicações relacionadas à biocompatibilidade e resistência mecânica, há a tentativa de desenvolver e aplicar materiais biomiméticos, com estimulação a nível celular, possuindo grande potencial regenerativo (CAUSA, 2007; LÖÖF, 2008; PIRES et al., 2015).

Dentre o grupo de materiais com potencial para biomimetização óssea, o cimento de aluminato de cálcio (CAC) se destaca por estar em coerência com a microarquitetura, apresentando características como a composição semelhante à do osso humano, alta biocompatibilidade sem rejeição pelo tecido ósseo, promovendo a osteointegração e osteocondução e ainda, a formação de hidroxiapatita na

superfície, quando em contato com fluido corporal, devido à bioatividade. Outros fatores determinantes citáveis para sua efetiva aplicação, incluem o baixo custo, alta pureza, fluidez, melhor ajuste e tempo de endurecimento, alta resistência mecânica (de aumento progressivo) e corrosiva, possuindo barreira contra a microinfiltração bacteriana e viscosidade adequada para utilização. De acordo com as características deste biomaterial, este possui potencial para aplicação como um scaffold, atuando como um compósito cerâmico reforçado (KOPANDA, 1990; ENGQVIST, 2004; ENGQVIST, 2008; LOOF, 2008; CASTRO-RAUCCI, 2011; AGUILAR, 2012; BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012; BURGER, 2013; SEO et al., 2014; PARREIRA, 2016).

Segundo Pompeu (2011), a reação de formação do CAC pode ser representada pela equação 1.



De acordo com esta equação, uma sequência de reações ocorre até a formação deste cimento. Em seguida, as fases deste devem ser selecionadas, conforme as propriedades desejadas em relação à reatividade em água. A fase CA ($CaO.Al_2O_3$) possui alta temperatura de fusão, hidratação lenta e um rápido endurecimento. Enquanto isso, a fase CA_2 ($CaO.2Al_2O_3$) possui hidratação lenta e se caracteriza mais refratária em relação à fase CA. Já a fase $C_{12}A_7$ ($12CaO.7Al_2O_3$) se hidrata rapidamente e possui baixa temperatura de fusão. Após a etapa de seleção das fases adequadas, o material deve ser hidratado para aplicações biológicas.

2.3 Nanotecnologia e aplicações biomédicas

Diferentes materiais são utilizados para o promover o reparo ósseo, mas não apresentam resultados altamente satisfatórios. A busca por um material biomimético levou ao conhecimento dos nanomateriais, cuja capacidade intrínseca de elevar o potencial de desempenho em aplicações biomédicas, emergiu o interesse pelo entendimento da biocompatibilidade e citotoxicidade destas aplicações (VIEIRA et al., 2017; PIRES et al., 2015).

Os nanomateriais são estruturas em escala nanométrica ($10^{-9} \text{ m} = 1 \text{ nm}$) que são formadas a partir do estudo do fenômeno e da manipulação de sistemas físicos,

ou nanotecnologia, que é uma área multidisciplinar que possibilita a criação e utilização dos menores materiais feitos pelo ser humano. Estes podem ser preparados pelas técnicas *bottomup*, que consiste em construir os materiais a partir de átomos ou moléculas individuais, ou através do *top down*, ou seja, quebra de partes maiores do material em nanopartículas, ambas por meio de uma síntese. Os nanomateriais podem se apresentar em diferentes formas, como partículas, fibras, tubos ou dispositivos (FERREIRA; RANGEL, 2009; CROSS et al., 2016; BERWIG; ENGELMANN, 2017).

Na área biomédica, a nanotecnologia possibilitou a melhora progressiva de instrumentações e metodologias tradicionais, na utilização de nanocristais, nanodispositivos, nanorobôs, nanotubos, nanovetores e nanopartículas produzidas de diversos materiais, além da possibilidade de agregação de várias moléculas na superfície destas nanopartículas. Esse campo científico pode auxiliar na capacidade de diagnóstico e tratamento permitindo o aperfeiçoamento de equipamentos médicos e cirúrgicos, na produção de novos processos e mecanismos de aplicação de fármacos, visando características de menor agressividade e invasividade, tornando-os mais eficazes (AMORIM, 2007; TRÉGOUËT, 2007; CANCELO, et al., 2014).

Nesse sentido, esses materiais, principalmente nanopartículas, nanofibras e nanotubos, são aplicados na engenharia de tecidos, utilizados em larga escala dependendo das características desses elementos. As nanofibras são muito porosas, possibilitando a colonização das células e uma eficiente troca de nutrientes. Enquanto os nanotubos constituem-se bons condutores, favorecendo a transmissão de sinais elétricos. Já as nanopartículas podem ser apresentadas em aspectos sólidos ou porosos, fornecendo versatilidade pelo diâmetro, química de superfície e componentes, com um destaque no campo da medicina regenerativa, pois possuem potencial de diferenciação celular para um fenótipo osteogênico *in vitro*. (CROSS et al., 2016; FANG et al., 2017; LI; LIU, 2017).

Neste contexto, a aplicação de nanoestruturas é capaz de acelerar a neoformação óssea e de vasos sanguíneos e remodelar o arranjo dos fatores de crescimento. Entretanto, algumas propriedades físicas e biológicas são necessárias como exigências para um substituto ósseo ideal, como o fornecimento de uma matriz porosa, controle de reabsorção e remodelação, promoção da diferenciação celular e regeneração de tecidos, além de combinar as propriedades mecânicas dos tecidos (BERWIG; ENGELMANN, 2017; GAO et al., 2017).

Atualmente, a engenharia de materiais dispõe esforços no desenvolvimento de compósitos estáveis que possam ser manipulados sem perder características relevantes, dado que podem ser efetivamente utilizadas para aplicações biomédicas, neste caso, no reparo ósseo. Portanto, a associação entre as nanopartículas e o CAC possibilita a criação de um microambiente semelhante em estrutura, forma e tamanho aos constituintes naturais dos ossos, aprimorando as propriedades mecânicas, osteointegração e osteocondução. (MARANGONI et al., 2013; PARREIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

Dentre o campo das nanopartículas, as metálicas são representadas principalmente pelo ouro, prata, cobre, ferro, zinco, chumbo, platina e alumínio. Estas, quando em associação com o CACH apresentam biocompatibilidade, citotoxicidade reduzida e são de fácil funcionalização, porém, a citotoxicidade a longo termo requer estudos complementares. Entre as nanopartículas metálicas, há um destaque para as nanopartículas de ouro (AuNPs) e nanopartículas de prata (AgNPs), dado que apresentam características únicas em consequência ao efeito quântico, sendo amplamente utilizadas na área da saúde (VIEIRA et al., 2017).

2.3.1 Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro (AuNPs) podem ser caracterizadas por colóides com propriedades ópticas intrínsecas decorrentes da ressonância plasmônica de superfície, que se caracteriza pela intensa absorção e dispersão quando um determinado comprimento de onda incide, devido a oscilação coletiva dos elétrons, relacionados com o tamanho e morfologia destes. Com isso, estas características, somadas à grande área superficial, podem ser controladas de acordo com o método de síntese apropriado, para a manutenção da morfologia da partícula e química de superfície (BAPTISTA et al., 2008; CHEN; SCHLUESENER, 2008; MELO JR; et al., 2012; PARREIRA, 2016; VIEIRA et al., 2017).

O diâmetro da partícula, de 1 a 100 nm possui relação estrita com a gama de cores da amostra coloidal, variando entre o amarelo, marrom, laranja, vermelho e roxo. A morfologia e o tamanho das AuNPs implicam em diferentes aplicações principalmente biomédicas, sendo assim, para uma aplicação direcionada às células, um esferoide de aproximadamente 20 nm é considerado adequado (BAPTISTA et al.,

2008; CHEN; SCHLUESENER, 2008; MELO JR; et al., 2012; PARREIRA, 2016; VIEIRA et al., 2017).

Com essa caracterização, as AuNPs são amplamente utilizadas na área biomédica e tecnológica, apresentando alta biocompatibilidade, encontradas em produtos de higiene pessoal, cosméticos, detecção de biomoléculas, carreadores de agentes terapêuticos com liberação controlada de fármacos, aprimoramento nas formulações diagnósticas e de tratamento para diversas doenças como o câncer, aumentando a eficácia dos fármacos (BAPTISTA et al., 2008; CHEN; SCHLUESENER, 2008; MELO JR; et al., 2012; PARREIRA, 2016; VIEIRA et al., 2017).

2.3.2 Nanopartículas de Prata

As nanopartículas de prata (AgNPs) são investigadas na aplicação de diversas áreas, principalmente na melhora da resposta biológica de materiais potencialmente contaminados, observados em desinfetantes, tecidos, tratamento de queimaduras, dispositivos contraceptivos, instrumentação cirúrgica, tintas, implantes e próteses ósseas, pelo destaque no efeito bactericida em concentrações mínimas, descritas como oligodinâmicas. Além disso, potencializam o efeito farmacológico de drogas, assim como as AuNPs. Em escala microscópica, a citotoxicidade pode ser observada em casos onde a utilização é feita com as partículas em tamanho diferente daquele adequado para aplicações biológicas (CHEN; SCHLUESENER, 2008; AMORIM; RANGEL, 2009; MELO JR; et al., 2012; PARREIRA, 2016; VIEIRA et al., 2017).

Portanto, a capacidade bactericida das AgNPs pode ser caracterizada como um atrativo na área médica, visto que as aplicações aloplásticas possuem o risco de infecção por estes microrganismos. Sendo assim, os íons de prata presentes nas nanopartículas impedem a adesão e, conseqüentemente, proliferação destas na superfície do biomaterial, pois penetram na membrana da bactéria e destroem o citoplasma. Para isso, a nanopartícula deve possuir um tamanho menor que 100 nm, entre, aproximadamente, 40 e 50 nm, o qual não apresenta risco de citotoxicidade para humanos. Assim como as AuNPs, estas características, somadas à grande área superficial, podem ser controladas selecionando o método de síntese adequado

(CHEN; SCHLUESENER, 2008; AMORIM; RANGEL, 2009; MELO JR; et al., 2012; PARREIRA, 2016; VIEIRA et al., 2017).

Uma das principais características das AgNPs, é a ressonância plasmônica de superfície, observada pela diversidade de cores relacionada às oscilações dos elétrons de condução, quando estão em ressonância com a luz incidente, apresentada da mesma forma pelas AuNPs (CHEN; SCHLUESENER, 2008; MELO JR; et al., 2012; PARREIRA, 2016; VIEIRA et al., 2017).

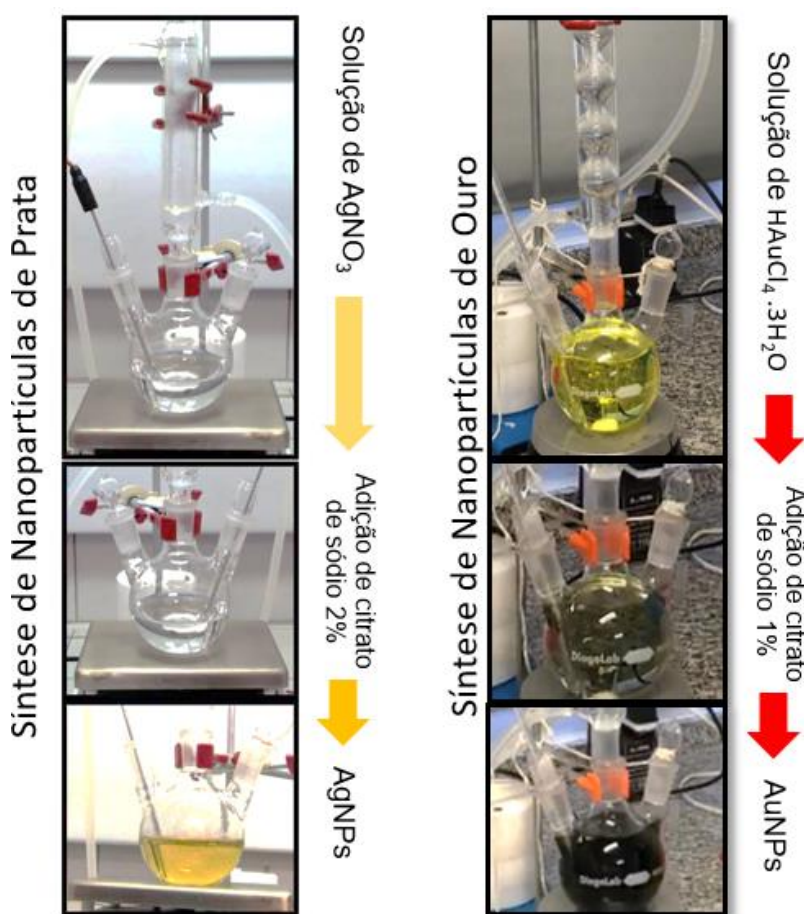
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Estes estudos foram desenvolvidos no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, nos Laboratórios de Nanosensores e de Processamento e Caracterização de Materiais Avançados I e II. Os experimentos em animais foram feitos por meio de uma parceria com o Laboratório de Tecido Ósseo da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

3.1 Síntese de nanopartículas

A síntese de nanopartículas de ouro e prata baseou-se na metodologia de Lee e Meisel (1982), para obtenção de coloides esféricos com dimensões nanométricas, conforme apresentado na Figura 6 (LEE; MEISEL, 1982).

Figura 6 - Síntese de Nanopartículas.



Fonte: Autora.

A síntese das AuNPs consistiu na redução do cloreto de ouro (III) trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 520918, Sigma Aldrich) pelo citrato de sódio tribásicodihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich). Uma solução de 500 ml de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,048%) foi aquecida sob agitação constante em um balão volumétrico de três pescoços até atingir seu ponto de ebulição. Em seguida, 50 mL de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1% foi acrescentado, preservando a temperatura de ebulição por mais uma hora. Logo após o período de estabilização, cessou-se o aquecimento e manteve a solução sob agitação até a temperatura ambiente.

As AgNPs foram obtidas pela redução de uma solução contendo 500 mL de nitrato de prata (AgNO_3 , Sigma Aldrich) (0,0182%) por 50 mL de citrato de sódio a 2% sob agitação constante em aquecimento de ebulição. O sistema foi mantido em aquecimento por 30 min, mantendo-se a agitação.

Ambas as soluções coloidais foram armazenadas a 4°C ao abrigo da luz. A qualidade do material produzido foi verificada pelas técnicas de caracterização de Espectroscopia UV-visível e Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS).

3.2 Caracterização das nanopartículas

3.2.1 Espectroscopia UV-Visível

Os espectros de absorções das amostras, na região UV-Visível do espectro eletromagnético, foram medidos no espectrofotômetro DeNovix DS-11 (DeNovix Inc., USA). A região espectral analisada foi de 190nm a 840 nm, com resolução espectral de 1 nm e caminho óptico de 1 mm. Para as leituras foram utilizados 2 μL da amostra depositadas no pedestal do equipamento. Os gráficos foram plotados para as análises dos resultados.

3.2.2 Diâmetro hidrodinâmico

A técnica por espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para determinar a distribuição de diâmetro hidrodinâmico das AuNPs e AgNPs, por meio do equipamento Zeta Sizer Nano – ZS90 (Malvern), com ângulo de 90°. Nesta

análise, um volume de 400 μL da solução coloidal foi adicionada à cubeta de poliestireno (Modelo ZEN0118, Sarstedt). Uma média de três análises por amostragem foi realizada para a obtenção do resultado e os gráficos foram plotados.

3.2.3 Diâmetro Hidrodinâmico

A técnica de DLS associada a aplicação de um potencial elétrico foi utilizada para determinar o Potencial Zeta das AuNPs e AgNPs. As medidas foram feitas no equipamento ZetaSizer Nano – ZS90 (Malvern), com ângulo de 90° , em cubeta capilar com eletrodo de ouro (modelo DTS1070, Malvern). Nesta análise, 1 mL de cada solução coloidal foi injetada vagarosamente na cubeta, com auxílio de uma seringa para evitar a formação de bolhas de ar. O valor do potencial Zeta foi a média aritmética de três análises.

3.3 Síntese do Nanocompósitos

O cimento de aluminato de cálcio hidratado foi fabricado por meio de moagem, em moinho de bola por uma hora. Neste processo foi feito a partir da mistura de CA (CaAl_2O_4) e CA_2 (CaAl_4O_7) na proporção molar de 1:1, com Castament FS60 (dispersante a 0,6% em peso, Basf, Alemanha) e um plastificante $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,8% em peso, Labsynth, Brasil).

Para a preparação dos nanocompósitos, as amostras foram preparadas utilizando suspensões aquosas (80% em peso de CACH) dividindo-se em grupos: 1) Grupo controle, 20% em peso de água tipo 1; 2) CACH+AuNPs, 20% em peso de suspensão coloidal de ouro 7×10^{11} nanopartículas/mL; 3) CACH+AgNPs, 20% em peso de suspensão coloidal de prata 7×10^{11} nanopartículas/mL. As amostras foram moldadas conforme a demanda das análises detalhadas nos próximos tópicos.

3.3.1 Análise de Bioatividade

Esta análise é feita por meio da imersão das amostras em uma solução padrão de Fluido Corporal Simulado (*Simulated Body Fluid* - SBF), analisando a formação de apatita. A preparação da solução SBF seguiu procedimento descrito na

literatura por Rigo (2004), como apresentado na Tabela 1. A solução foi preparada utilizando-se uma quantidade dos reagentes em uma proporção 1,5 vezes superior à concentração de íons (mM) inorgânicos presentes no plasma humano, permitindo acelerar a formação de apatita.

Tabela 1 - Reagentes usados na preparação de um litro de solução de fluido corporal simulado (*Simulated Body Fluid* - SBF) de acordo com Rigo.

Reagente	SBF 1,5 Rigo
H ₂ O	400 mL
NaCl	11,992 g
NaHCO ₃	0,529 g
KCl	0,335 g
K ₂ HPO ₄	0,261 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,458 g
HCl 0,1M	15 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,551 g
Na ₂ SO ₄	0,107 g
(CH ₂ OH)3CNH ₂ - 0,05M	Teor necessário para ajuste pH= 7,25
HCl 0,1M	Teor necessário para ajuste pH= 7,25

Fonte: Adaptado de Rigo (2004).

3.4 Caracterização Estrutural dos Nanocompósitos

3.4.1 Densidade real das amostras

Para este ensaio foram preparadas amostras em molde quadrado (com arestas de 20 mm e 4 mm de espessura). Após a cura, as amostras foram desmoldadas, secas a 110°C por 24 h. Os valores de densidade real foi uma média de 10 leituras para cada amostra, que foram medidas no Picnômetro de hélio (Ultracyc 1200e, V5.04, Quantachrome).

3.4.2 Resistência mecânica à compressão uniaxial, porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros

Para estes ensaios, as amostras foram preparadas em moldes de formatocilíndrico (16mm de diâmetro x 18mm de altura). As amostras foram condicionadas a 37 °C, em estufa de ambiente saturado durante 24 h, desmoldadas,

secas a 110°C por 48 h e submetidas a medidas de porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros (ensaios sem tratamento).

Para comparar as propriedades mecânicas e morfologia após ensaio de bioatividade. Outros grupos de amostras foram imersa em solução de fluido corporal (SBF) e retornados para a estufa a 37°C. Após 168 h de cura, amostras úmidas foram submetidas a ensaios de resistência à compressão uniaxial, enquanto outras foram secas a 110°C durante 48h para as medidas de porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros.

A resistência à compressão uniaxial foi medida usando uma máquina de ensaios EMIC DL10000, com velocidade de deslocamento de 0,15 mm/min em pelo menos cinco amostras de cada composição. A tensão de ruptura σ_R (MPa) foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$\sigma_R = \left[\frac{4P}{\pi D^2} \right] \quad [1]$$

sendo P (N) é a carga máxima requerida para fraturar cada amostra e D (mm) é o diâmetro médio das amostras.

A porosidade aparente foi avaliada de acordo com o método de imersão (princípio de Arquimedes), usando querosene como líquido de imersão (ABNT NBR 6220). As amostras em triplicata foram inicialmente pesadas a seco (M_s) e após 1 hora de imersão em querosene ($\rho=0.80\text{g/cm}^3$) sob vácuo, as amostras foram novamente pesadas quando imersas no líquido (M_i) e úmidas (M_u). Assim, a porosidade aparente foi calculada pela massa de líquido retida em seus poros abertos por meio da Equação 2.

$$PA = \left[\frac{(M_u - M_s)}{(M_u - M_i)} \right] \times 100 \quad [2]$$

A distribuição de tamanho de poros foi medida por meio da técnica de porosimetria de intrusão de mercúrio (Autopore IV 9500, Micromeritics). A técnica é baseada na equação de Washburn, sendo D é o diâmetro do poro, P é a pressão aplicada, γ é a tensão superficial do mercúrio e ϕ é o ângulo de contato (130°) entre o mercúrio e a amostra. O volume de mercúrio (V) que penetra os poros é medido diretamente em função da pressão aplicada (P) pela Equação 3.

$$D = 4\gamma P^{-1} \cos(\phi) \quad [3]$$

3.4.3 Resistência mecânica à flexão 3 pontos

Para este ensaio, as amostras foram preparadas em moldes em formato de barra (75 mm comprimento x 12,5 mm altura x 12,5 mm de largura). As amostras após a moldagem foram mantidas a 37 °C, em uma estufa em ambiente saturado, durante 24 h. Então foram desmoldadas e imersas em solução de SBF e mantidas em estufa a 37 °C. Após 168 h, as amostras úmidas foram submetidas a ensaios de resistência à flexão.

A resistência à flexão foi medida a uma velocidade de 0,5 mm/min (ASTM C674), para pelo menos cinco amostras de cada composição, usando uma máquina de ensaios mecânicos (DL 10000, EMIC). A configuração em três pontos foi adotada a 30 mm de distância entre os pontos de apoio. O módulo de ruptura (σ_R) foi calculado por meio da Equação 4.

$$\sigma_R = \left[\frac{3Fl}{2bd^2} \right] \quad [4]$$

sendo, F (N) é força máxima na fratura, l (mm) distância entre os apoios, b (mm) largura do corpo de prova, d (mm) espessura do corpo de prova.

3.4.4 Dureza

A dureza foi medida utilizando o Durômetro Vickers FV-100e. Para isso inicialmente realizou-se um teste utilizando cargas de 1 a 100 kgf a fim de determinar a célula de carga adequada para o ensaio. Assim foi determinado uma carga de 980,7 mN para CACH e 490,7 mN para os nanocompósitos. Posteriormente, posicionou-se a amostra abaixo do penetrador e iniciou-se o teste, sendo repetida por oito vezes, em regiões próximas ao seu centro. Após a remoção da carga, foi medido o valor das diagonais da impressão produzida no material por meio de um micrometro acoplado a um microscópio. Desta forma foi calculada a área da superfície impressa pela medição das diagonais, quando o Número Vickers

(HV) é determinado pela razão entre a carga (F) e a área superficial da impressão (A, mm²), por meio da equação 5.

$$HV = \frac{F}{A} = \frac{2 \cdot F \cdot \sin \frac{136^\circ}{2}}{d^2} \approx 1,8544 \frac{F}{d^2} \quad [5]$$

Sendo F é a carga aplicada sobre a amostra (mN); d é a soma das diagonais dividido por dois; HV = dureza Vickers (kgf/mm²)

3.5 Aplicações dos Nanocompósitos - Ensaios *in vitro*

3.5.1 Cultura Celular

Os testes *in vitro* foram realizados na linhagem celular MG-63, caracterizada por células do tecido ósseo de morfologia fibroblástica, provindo de um osteossarcoma (Banco de Células do Rio de Janeiro, 2019). Esta foi cultivada em monocamada em garrafas estéreis de polipropileno de 25 cm², contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma Aldrich), complementado com 1,5g/L de bicarbonato de sódio, complementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Life Technologies, 16000-044). A cultura celular foi mantida em estufa de crescimento à 37°C (Thermo Scientific, water Jacket serie 8000) em uma atmosfera de 95% de umidade com adição de 5% de CO₂. O meio de cultura foi substituído de acordo com a confluência e as células subcultivadas a cada 20 dias, tripsinizadas com solução de Tripsina-EDTA a 0,25%.

3.5.2 Avaliação da Atividade Mitocondrial

A viabilidade celular foi determinada pela aplicação do teste colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio, Sigma Aldrich, M5655). Para a realização do teste, a linhagem celular foi tripsinizada e incubada em três placas de 24 poços, uma para cada dia, realizado em 24, 72 e 120 h de experimento, a uma concentração de 1x10⁵ células/poço com 1,5 mL de meio de cultura completo em estufa de crescimento (Water Jacket series 8000, Thermo Scientific) a 37°C sob uma atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h de adesão celular, o meio de cultura foi retirado e foram acrescentados 1,2 mL de meio em cada um dos

poços. Em seguida, foram adicionados minicesto de poliestireno com membrana de policarbonato (Thincert, Greinerbio-one) em cada um dos poços. Na área interna do minicesto, foram depositados os cimentos CACH, CACH + AuNPs e CACH + AgNPs, em triplicata. Após os tempos experimentais, os minicestos foram retirados, as placas centrifugadas a 2000 rpm por 10 min. Após este processo, as placas foram incubadas com a solução de MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) a 2 mg/mL na estufa de crescimento à 37°C, por 4 h. Este teste analisa as células metabolicamente ativas em uma cultura celular, pois pela atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais, o MTT (coloração amarela) é reduzido em cristais de formazan (coloração azul), que é diretamente proporcional à atividade mitocondrial (MOSMANN, 1983)

A leitura de absorção foi realizada em triplicata pelo espectrofotômetro Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, USA). Este procedimento foi realizado no laboratório de Bioquímica Aplicada a Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (UNIVAP). A atividade mitocondrial dos grupos foi expressa em porcentagem, quando comparadas as absorbâncias aos grupos controle, conforme descreve a Equação 6.

$$\textit{Atividade Mitocondrial (\%)} = \frac{\textit{Abs}_{\textit{amostra}} - \textit{Abs}_{\textit{branco}}}{\textit{Abs}_{\textit{controle}} - \textit{Abs}_{\textit{branco}}} \quad [6]$$

3.6 Aplicações dos Nanocompósitos - Ensaios *in vivo*

Foram utilizadas 20 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variante *albinus*, Wistar), pesando cerca de 300 gramas cada, para avaliar a neoformação óssea na interface osso-biomaterial. Aos 90 dias de idade, foi realizado um defeito ósseo monocortical de 3,0 mm de diâmetro em cada fêmur direito de todos os animais, os quais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n = 4). Antes da cirurgia, os animais foram pesados e anestesiados e a mesa cirúrgica foi preparada.

Os fármacos utilizados nos procedimentos anestésicos e suas respectivas concentrações foram: cloridrato de xilazina 2,3 g / 100 mL (Anasedan® - Vetbrands, Jacaré - Brasil), substância sedativa e relaxante muscular; e cloridrato de cetamina

1,16 g / 10 mL (Dopalen® - Vetbrands, Jacaréi - Brasil), anestésico geral. Inicialmente, foi preparada uma solução contendo a mistura de 0,8 ml de cloridrato de xilazina e 0,5 ml de cloridrato de cetamina. Após anestesia dos animais, os locais cirúrgicos do fêmur direito foram submetidos a tricotomia e antissepsia com solução de álcool iodado, conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Imagens do procedimento cirúrgico: a) procedimento do defeito ósseo; b) defeito finalizado; c) cimento injetado no orifício; c) procedimento cirúrgico finalizado.



Fonte: Autora em Colaboração com a UNESP (2020)

As incisões foram realizadas na região correspondente à face medial dos fêmures. Os músculos foram divididos para expor o osso cortical, onde um defeito com diâmetro final de 3,0 mm foi realizado utilizando brocas de diâmetro progressivo, sob irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, visando evitar superaquecimento, devido ao atrito das brocas com o osso. Enquanto os

defeitos ósseos foram feitos, os cimentos foram preparados. Após a preparação, os cimentos foram injetados, utilizando seringas hipodérmicas, nos defeitos ósseos preparados.

Após o preenchimento dos defeitos com materiais injetáveis, os tecidos foram reposicionados e a camada muscular e a pele foram suturadas com fio de seda nº 4 (Ethicon / Johnson & Johnson). Novamente, a antissepsia foi realizada com álcool iodado. No final da cirurgia, um medicamento analgésico (dipirona sódica 150 mg / kg) foi administrado por via subcutânea a cada 8 h até 48 h após a cirurgia. Após a cirurgia, os ratos foram colocados em gaiolas, cada uma contendo 5 animais, com ração e água ad libitum, em ambiente com ar-condicionado. Durante esse período pós-operatório, eles foram monitorados, inicialmente, 2 h após o período de recuperação anestésica e a cada 24 h até o período de eutanásia de 30 dias. As peças, após a eutanásia, foram mantidas em formalina tamponada a 10%.

3.6.1 Análise Histológica

O fragmento ósseo em cada um dos fêmures direitos, contendo a mistura, foi removido após a eutanásia e, em seguida, fixado em formaldeído tamponado a 10%; depois as peças foram desmineralizadas por imersão em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA Titriplex III, EMD Millipore, Massachusetts, EUA). Após a desmineralização, os blocos foram fixados em parafina e cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos longitudinalmente para análise histológica na interface de mistura óssea. A análise da reação tecidual apresentada pelos diferentes materiais foi realizada em microscópio óptico Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Eventos histopatológicos como presença de células mononucleares e polimorfonucleares, macrófagos, osteoclastos, além da presença de reabsorção óssea, foram consideradas necrose tecidual para avaliação do reparo ósseo.

A porcentagem de osso neoformado na interface osso-material foi avaliada em três campos de cada fragmento contendo os diferentes materiais, representando interface medial, distal e nova formação óssea embaixo do material. Cinco seções continham os materiais foram digitalizados (25x), usando Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) associado ao Axiocam MRC 5 (Zeiss).

Posteriormente, 75 áreas de cada material foram analisadas e a nova porcentagem óssea foi calculada usando o software de imagem Image J (NIH).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das caracterizações das Nanopartículas e das propriedades mecânicas, morfológicas e bioatividade do nanocomposito foram objeto de publicação na revista “*Researchon Biomedical Engineering*”, no artigo intitulado de “*Compositions of calcium aluminate cement containing gold and silver nanoparticles for biomaterial applications*”. Importante ressaltar, que este foi o primeiro trabalho no grupo na área de biomateriais para reparo ósseo, mostrando a viabilidade da associação de nanopartículas para o aumento da biocompatibilidade de CACH, que já está bem consolidado na literatura.

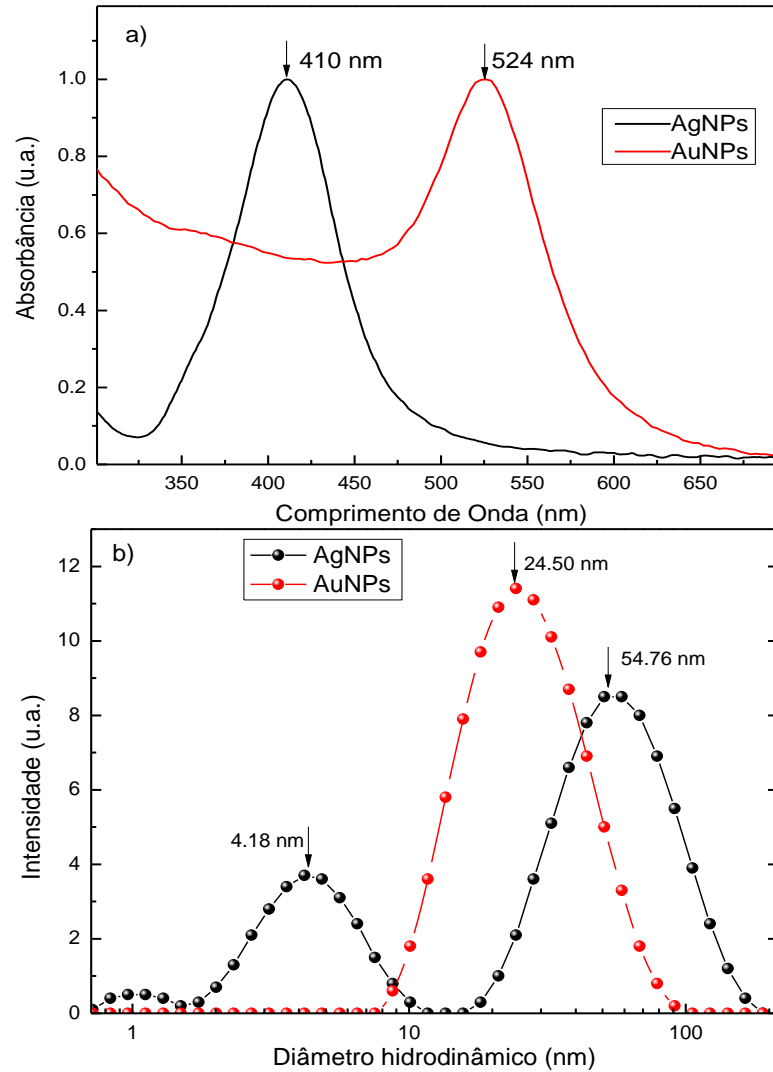
Enquanto, que os resultados dos testes in vitro e in vivo foram submetidos na revista “*Journal of Biomedical Materials Research: Part B – Applied Biomaterials*”, no artigo intitulado de “*In vitro and in vivo investigations of calcium aluminate cement associated with nanoparticles for biocompatibility and bone neoformation improvements*”

4.1 Nanopartículas de Ouro e Prata

A Figura 8 apresenta os resultados da caracterização das soluções coloidais de AuNPs e AgNPs, que foram incorporadas no CACH. Este resultado é importante, pois permite verificar se nanopartículas possuem dimensões nanométricas, quando suas propriedades, conforme descrito no item 2.3, são diferentes dos materiais em dimensões macroscópicas, permitindo interações que viabilizem o aumento de biocompatibilidade.

Neste gráfico, as AuNPs têm uma banda característica de ressonância plasmônica de superfície (SPR) em 524 nm, com distribuição de diâmetro unimodal. As AgNPs a banda SPR está centrada em 410nm, mas foi observado uma distribuição bimodal de diâmetros, que é resultado aceitável para este material, devido à dificuldade do controle dos parâmetros de síntese.

Figura 8 - Nanopartículas de Ouro e Prata: a) Espectro UV-Visível e b) Diâmetro hidrodinâmico.



Fonte: Autora (2020).

Na análise do espectro UV – visível das AuNPs a banda de SPR centrada em 524 nm está associada a nanomateriais de dimensões na escala nanométrica, visto que, a posição desta banda está relacionada com o diâmetro médio das nanopartículas sintetizadas (VIJAYAKUMAR et al., 2011; SINDHU et al., 2014; CAMPOS et al.). Este resultado corrobora com as análises de DLS, mostrando o diâmetro hidrodinâmico de $21,52 \pm 0,26$ nm. Para as AgNPs, a banda SPR está centrada em 410 nm, com uma solução coloidal composta de duas distribuições de tamanhos uma em 4,18 nm e outra em 54,76 nm. A banda de absorção de SPR tem origem na proximidade entre as bandas de condução e valência, permitindo que os

elétrons se movam livremente e oscilem coletivamente em ressonância com a onda eletromagnética incidente, sendo dependente do tamanho das partículas, do meio dielétrico e do ambiente química (ZHANG et al, 2016). Os valores de potencial Zeta medidos foram de -50 ± 18 mV e -41 ± 2 mV, para as AgNPs e AuNPs, respectivamente. Importante ressaltar, que a magnitude do potencial Zeta é indicativo da estabilidade coloidal, quando valores potenciais Zeta superiores a 30 mV ou inferiores a -30mV estão correlacionados com alto grau de estabilidade. (GORUP, 2010, ANDRADE 2008). Portanto, as nanopartículas produzidas estão nas dimensões adequadas para aplicação no CACH.

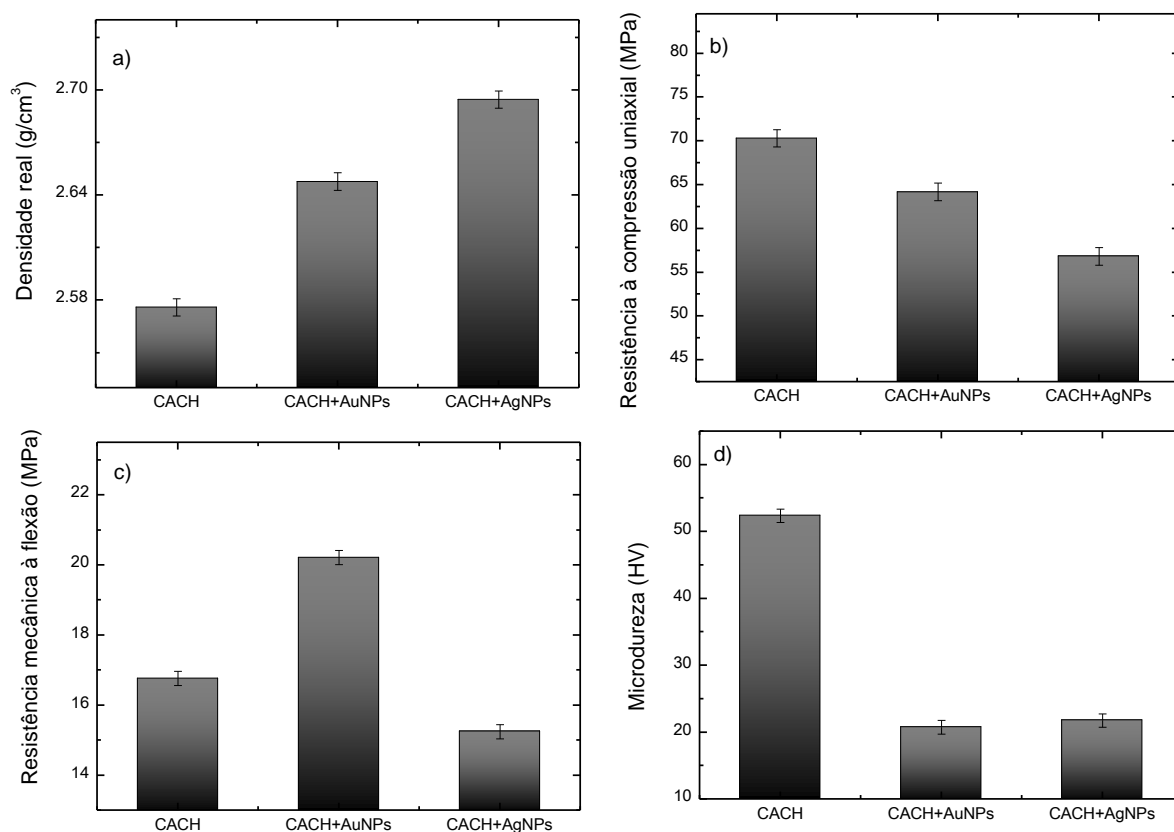
4.2 Nanocompósitos de Ouro e Prata

Atualmente, os CACH associados ou não a outros materiais vem sendo amplamente empregado para o tratamento do tecido ósseo, devidos as suas propriedades mecânicas e aos resultados clínicos positivos no tratamento de fraturas ósseas (AJAXON et al., 2018). De acordo com Pereira (2011), as propriedades mecânicas do tecido ósseo podem ser divididas em intrínsecas, que se referem ao comportamento do material somente em nível teciduais e extrínsecas que se referem ao osso como um todo, refletindo em seus valores os efeitos combinados do tamanho, da forma e das características teciduais que podem ser determinadas por meio do teste de resistência à flexão por três pontos e de compressão.

Assim, a análise da resistência à flexão e compressão em biomateriais empregados em sítios ósseos é de suma importância, visto que as regiões de tecidos duros tendem a receber grandes tensões. Portanto, a concentração de tensões acima do limiar do material, podem resultar em microfraturas que favorecem proliferação de bactérias, infiltração e deslocamento do material, fatores contribuem para o insucesso clínico do material (PEREIRA et al., 2011).

Os resultados da caracterização quanto à densidade teórica e propriedades mecânicas das amostras CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs são apresentadas na Figura 9, sendo possível notar que a incorporação de nanopartículas ao CACH modificou suas propriedades.

Figura 9 - Propriedades mecânicas das amostras e CACH, CACH+ AuNPseCACH+ AgNPs: a) Densidade real; b) Resistência à compressão uniaxial; c) Resistência mecânica à flexão; d) Microdureza.



Fonte: Autora (2020)

F

Os valores de densidades dos compostos estudados (CACH, CACH + AuNPs e CACH + AgNPs) apresentaram comportamento similar, indicando que os métodos fornecem resultados suficientemente reprodutíveis. Observa-se que os valores medidos ($\sim 2,5 \text{ g/cm}^3$) foram próximos ao relatado na literatura para o osso que varia de $1,5\text{-}2,2 \text{ g/cm}^3$ e superior ao apresentado pelo cimento ósseo de Polimetilmetacrilato (PMMA) ($\sim 1,3 \text{ g/cm}^3$). Ressaltando que a literatura é controversa quanto à variabilidade das leituras de densidade óssea nos diferentes sítios esqueléticos (SCHEIBEL et al., 2009).

Os valores de resistência a compressão uniaxial e microdureza para as amostras de CACH+AuNPs e CACH+AgNPs foram menores que a amostra padrão de CACH. Entretanto, as amostras de CACH+AuNPs mostraram os melhores

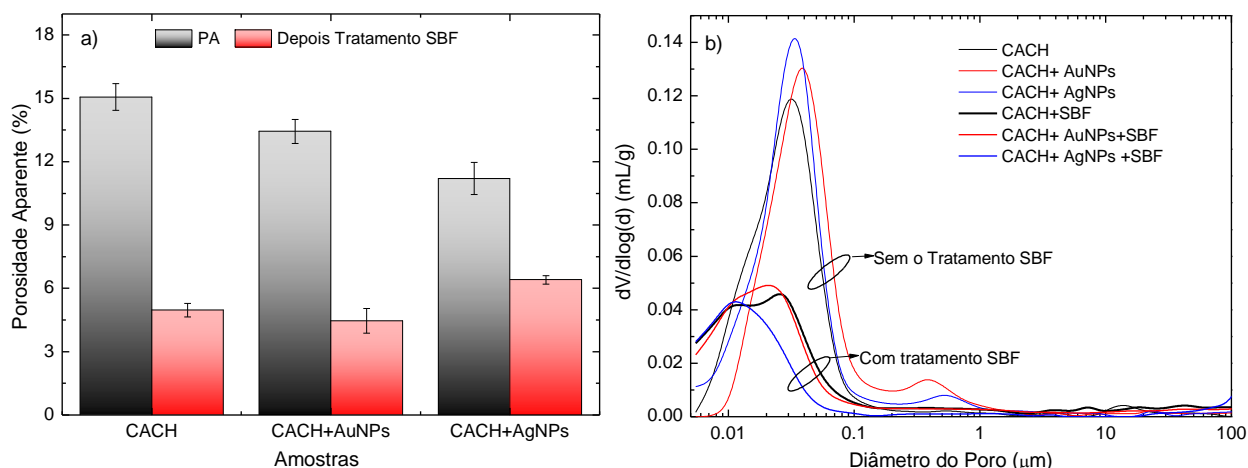
resultados de resistência mecânica a flexão. Esses valores de resistência à compressão uniaxial ficaram abaixo do valor observado para o osso humano corticalna faixa de 88-230 MPa (BONAN, 2014).

Entretanto, na literatura existe uma grande variação na resistência à compressão, dependendo da formulação do CACH (ZHANG et al., 2014, AJAXON, PERSSON, 2017). Ajaxon et al. (2018), ressalta que para alguns casos, onde as fraturas são restritas a uma determinada região e quando o cenário de carga esperado é principalmente compressivo, os cimentos a base de CACH podem fornecer suporte adequado e ser a escolha preferida em relação aos materiais menos biocompatíveis usados atualmente, por exemplo, cimentos ósseos acrílicos.

Na análise de flexão as amostras de CACH+AuNP apresentou a maior resistência a flexão, seguida das amostras de CACH e CACH+AgNPs, respectivamente. Evidenciando que houve um ligeiro aumento da resistência a flexão do CACH, quando associado as nanopartículas de ouro. No entanto, os resultados são inferiores ao verificado para o osso cortical (compacto) longitudinal que apresenta resistência a flexão de 50-150 MPa (BONAN et al., 2014) ou 100-200 MPa (MUNDSTOCK et al., 2010) e o cimento ósseo PMMA 50,7 MPa (SOUZA et al., 2010).

Os resultados de porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros para as amostras CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs são apresentados na Figura 10. Todas as amostras após tratamento com SBF obtiveram uma redução de porosidade aparente e diâmetro de poros.

Figura 10 - Distribuição de tamanho de poros, tamanho médio de poro e porosidade antes e após tratamento com SBF por sete dias das amostras CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs. Porosidade aparente para as amostras CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs.

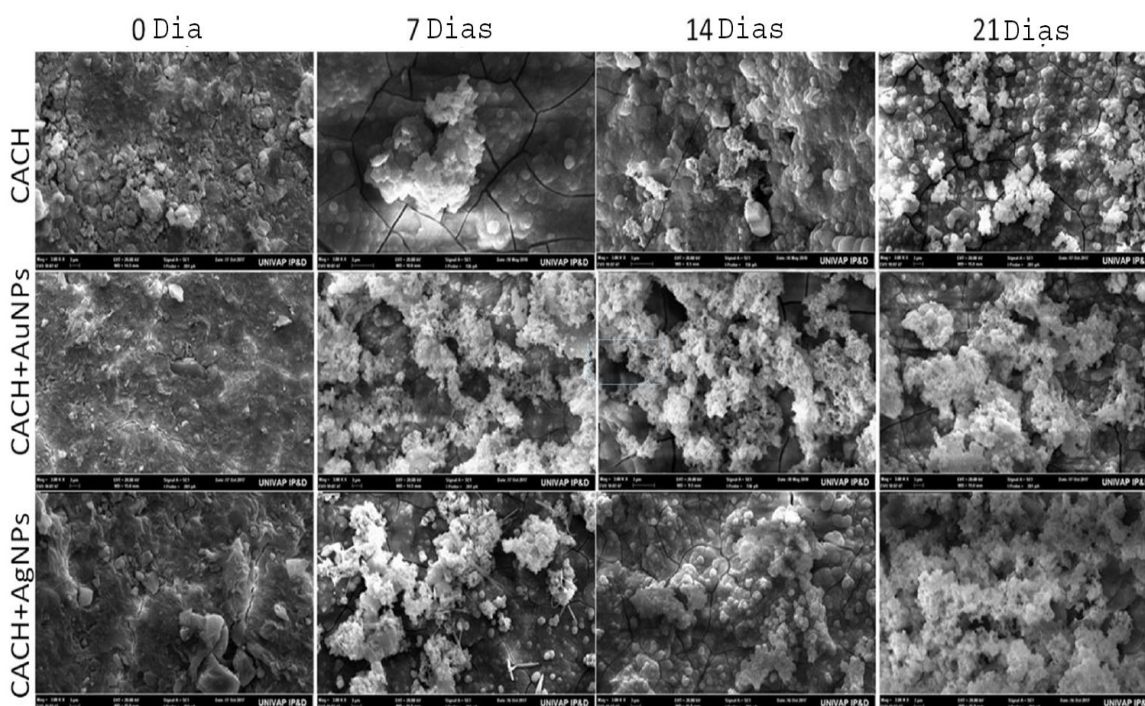


Fonte:

Autora (2020)

Os resultados da porosimetria ($dv/dlog$) são referentes a dimensão dos poros pós-aplicação dos compostos estudados (CACH, CACH+AuNP e CACH+AgNP) associados ou não a SBF. Neste estudo, observou-se menor formação de poros, bem como, deslocamento significativo referente aos tamanhos dos poros, onde foi possível identificar valores inferiores pós-interação com a SBF, o qual foi observado para todas as composições estudadas, as quais foram submetidas a incorporação com a SBF. Segundo Demirtaş; Kaynak e Gümüşderelioğlu (2015) e Oliveira et al. (2018) enfatizam que estes resultados, podem ser explicados mediante presença de precipitado na superfície dos materiais, que indicam princípios de bioatividade entre os compostos, com excelente interação com tecidos vivos, visto que, a formação de precipitado, deriva-se da interação dos cimentos aos compostos disponíveis na solução SBF, revestindo a superfície sólida e preenchendo os poros, reduzindo sua porosidade aparente pós-intervenção com o SBF. Este resultado pode ser confirmado por meio das micrografias de MEV, quando se observa a formação de precipitado na superfície do material (Figura 11).

Figura 11 - Análises por microscopia eletrônica de varredura da superfície das amostras CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs antes e após contato com solução SBF por 7, 14 e 21 dias. Análises por microscopia eletrônica de varredura da superfície das amostras CACH.



Fonte: Autora (2020)

Neste contexto, a fase de hidroxiapatita carbonatada que se forma na superfície do material bioativo é química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso. É esta equivalência que é responsável pela ligação interfacial, permitindo uma ligação química ao osso (SEABRA, 2013). Essa precipitação promove fechamento dos poros, justificando a queda de porosidade aparente após tratamento com SBF. Segundo Rodrigues et al. (2016), bioatividade é o resultado das reações químicas que ocorrem na superfície de um material exposto aos fluidos corporais para formar uma camada superficial de apatita hidroxil-carbonatada após a implantação, que é um critério essencial para estabelecer a ligação com o osso natural.

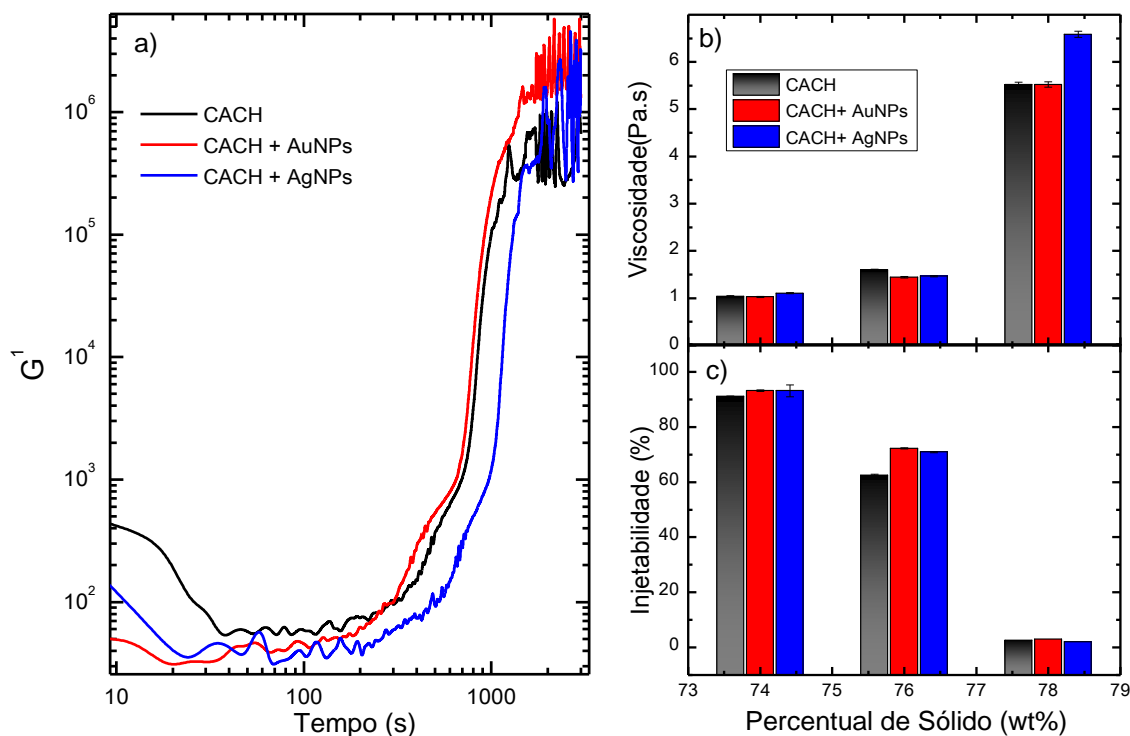
O estudo do comportamento biológico de scaffolds na SBF é considerado o método mais eficiente para autenticar sua bioatividade no ambiente corporal. Marquis et al. (2009); Harvey; Henderson e Vengallatore (2010); Khang et al. (2010); Kubinova e Sykova (2010) e Vallet-Regi (2010) afirmam em seus estudos que biomateriais compatíveis ao tecido biológico podem favorecer um ambiente

adequado para a proliferação celular e a matriz de crescimento. Uma vez que durante o processo de cicatrização óssea, esses materiais podem ser degradados e até gerarem resposta imunológica. Isto deve-se ao fato de que o tempo de degradação depende da propriedade, densidade e enzimas existentes nos tecidos ósseos

Os resultados de viscosidade e injetabilidade em função do teor de sólidos são apresentados na Figura 12. A faixa de percentual de sólidos nas suspensões foi entre 76 e 78 %, observando menor injetabilidade para as amostras com maior teor de sólidos, que era um resultado esperado. É importante ressaltar que não houve alterações significativas da injetabilidade das suspensões de CACH quando misturas com AuNPs ou AgNPs, sendo uma função do teor de sólidos. Este parâmetro visa a produção de pastas com coesão contendo o máximo de sólidos possível, sendo bastante importante em situações clínicas.

No caso de defeitos/traumas ósseos com acessibilidade limitada, o emprego do cimento de forma precisa pode ser essencial para o sucesso do tratamento (RIGO et al., 2004; ALVES et al., 2006; JABERI et al., 2013). Nas cerâmicas injetáveis são originárias de cerâmicas ligadas quimicamente, cujo comportamento de presa é controlado por reações químicas específicas que podem ocorrer à temperatura ambiente como cimentos aluminato-cálcio (CAC).

Figura 12 - Imagens para injetabilidade manual para suspensões aquosas de CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs com teor de sólidos de 76 e 78% em peso, usando agulha hipodérmica. Ensaio reológico oscilatório (G' e G'') a 37°C em função da frequência para suspensões.



Fonte: Autora (2020)

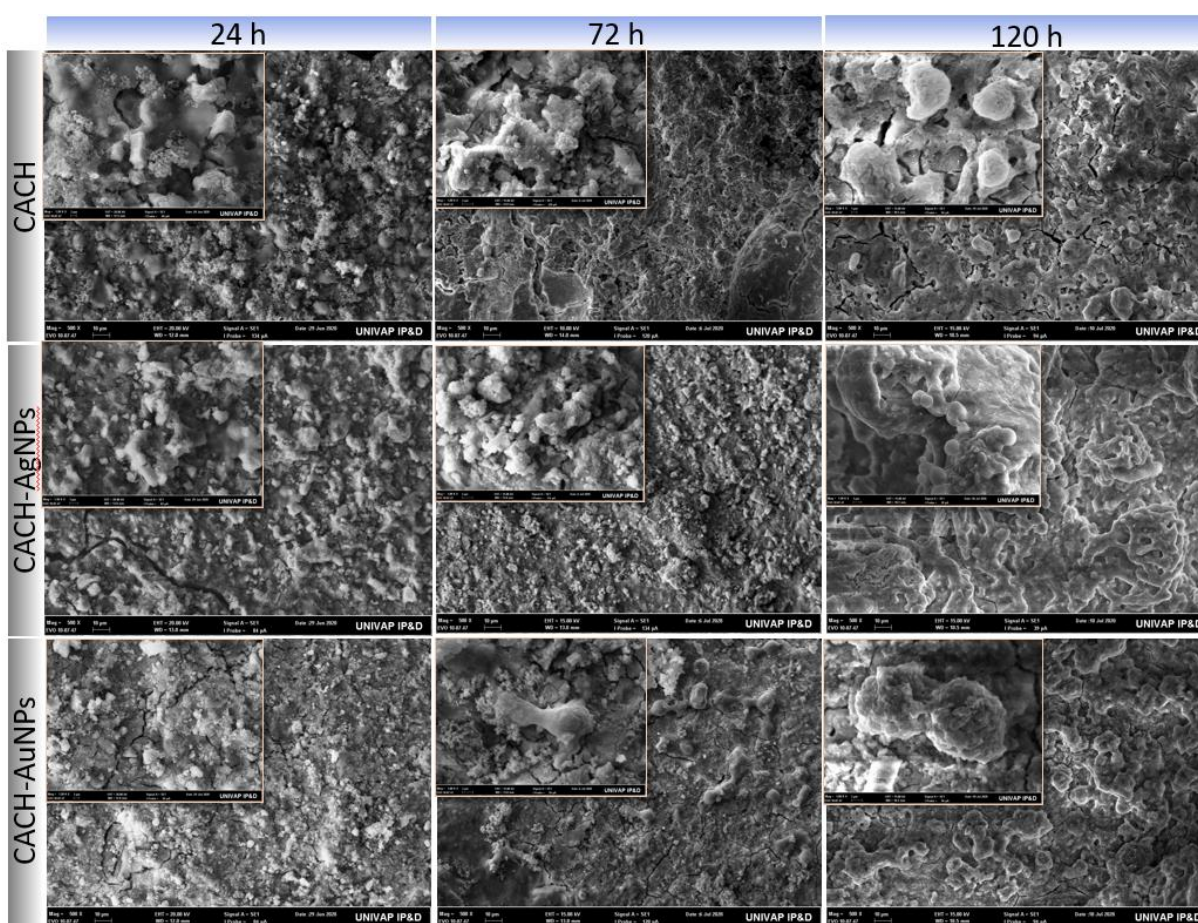
4.3 Nanocompósitos testes *in vitro*

Esta pesquisa tem como base registros na literatura que relatam as AuNPs, com cerca de 20nm de diâmetro, têm grande potencial na regulação da atividade dos osteoblastos, aumentando a fosforilação ERK / nível total de ERK, o que sugere a ativação da via ERK / MAPK. Na verdade, essa via está relacionada ao controle da proliferação e diferenciação, as nanopartículas também podem aumentar o número do nódulo ósseo e o conteúdo de cálcio, registrado em teste *in vitro* (ZHANG et al., 2014). Enquanto as AgNPs influenciam a regulação das expressões RUNX2 que é o fator de transcrição mais upstream essencial para a diferenciação dos osteoblastos, devido à regulação da expressão de Sp7 (KOMORI, 2017).

Neste âmbito, ambas as nanopartículas foram utilizadas com o intuito de melhorar o reparo ósseo e foram associadas ao CACH. A Figura 13 apresenta as

micrografias da superfície das amostras CACH, CACH+AgNPs e CACH+AuNPs, sendo possível observar a evolução da superfície em função do tempo de incubação. Este resultado mostra a influência das células e do microambiente do meio na morfologia. Nas primeiras 24 h não é evidente diferenças entre os grupos experimentais. Este resultado sugere o início da adesão celular/proliferação. Porém, as micrografias em 72h e 120h mostram uma nova morfologia, que indica a formação de camadas formadas pela proliferação celular. Este fato é mais evidente, quando comparamos com a Figura 11, que registrou as mudanças morfológicas da interação dos cimentos aos compostos disponíveis na solução SBF.

Figura 13 - Análises por microscopia eletrônica de varredura da superfície das amostras CACH, CACH+ AuNPs e CACH+ AgNPs em contato com cultura celular por 24, 72 e 120 dias.

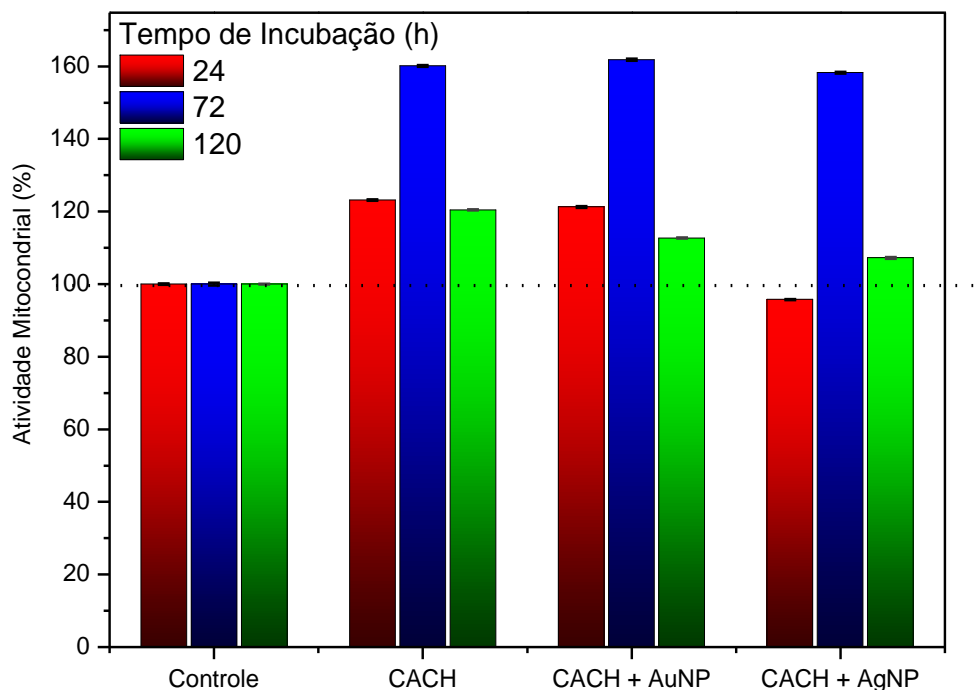


Fonte: Autora (2020)

A Figura 14 apresenta os resultados das medidas de atividade mitocondrial (AM), que exibe um aumento de aproximadamente 34,6% quando aplicado o CACH, 32% quando aplicado o CACH + AuNPs e 20% quando aplicado o CACH + AgNPs, em comparação ao grupo controle. Quando analisados os dias experimentais, é possível observar que em 24 h houve um aumento médio de 10% na atividade mitocondrial, considerando a média dos grupos amostrais. Enquanto que em 72 h houve um aumento drástico de 45%, retornando a valores menores em 120h.

Quando os resultados de AM são associados as mudanças de morfologia registradas nas micrografias, pode-se sugerir algumas fases. Nas primeiras 24 h a adesão celular é mais evidente, com poucas modificações de superfície associadas a um ligeiro aumento de AM, com a exceção do grupo CACH+AgNPs. Para 72 h, a proliferação celular é mais evidente, com valores de AM mais significativos associados a mudanças morfológicas em todos os grupos. Para 120 h, a superfície está totalmente preenchida, quando os valores de AM voltam a patamares próximo daqueles registrados para 24h.

Figura 14 - Atividade mitocondrial da linhagem MG-63 após aplicação do CAC.



Fonte: Autora (2020)

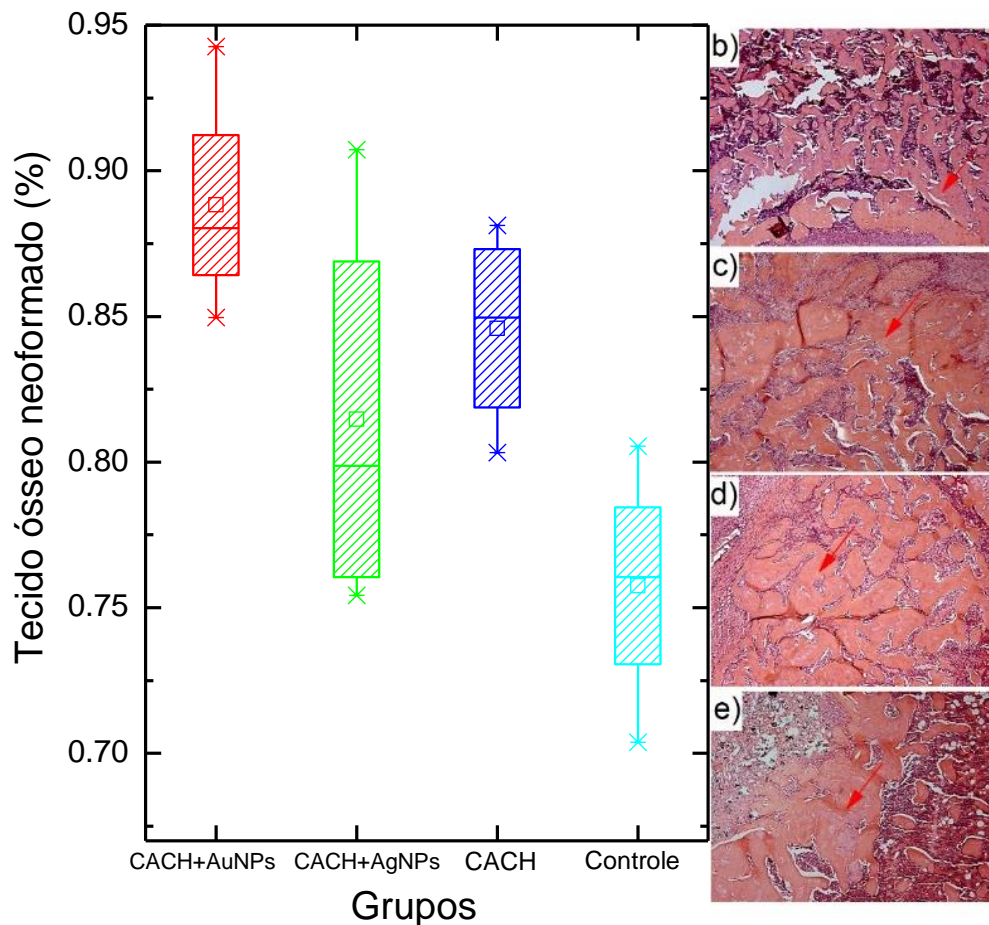
Os resultados de AM acima de 70% sugerem materiais biocompatíveis, as micrografias apresentam proliferação (ISO-10993-5-2009). Em resumo, os

resultados indicam que CACH, CACH + AuNPs e CACH + AgNPs são elegíveis para testes *in vivo*.

4.4 Nanocompósitos testes *in vivo*

Após levar em consideração os resultados das propriedades mecânicas dos cimentos e das análises *in vitro*, a aplicação *in vivo* é um passo importante para verificar a viabilidade de estudos clínicos. A análise histológica revela neoformação óssea e os resultados da quantificação são apresentados na Figura 15, sendo possível observar a variabilidade entre o percentual de neoformação óssea entre os grupos, permitindo comparar os grupos experimentais.

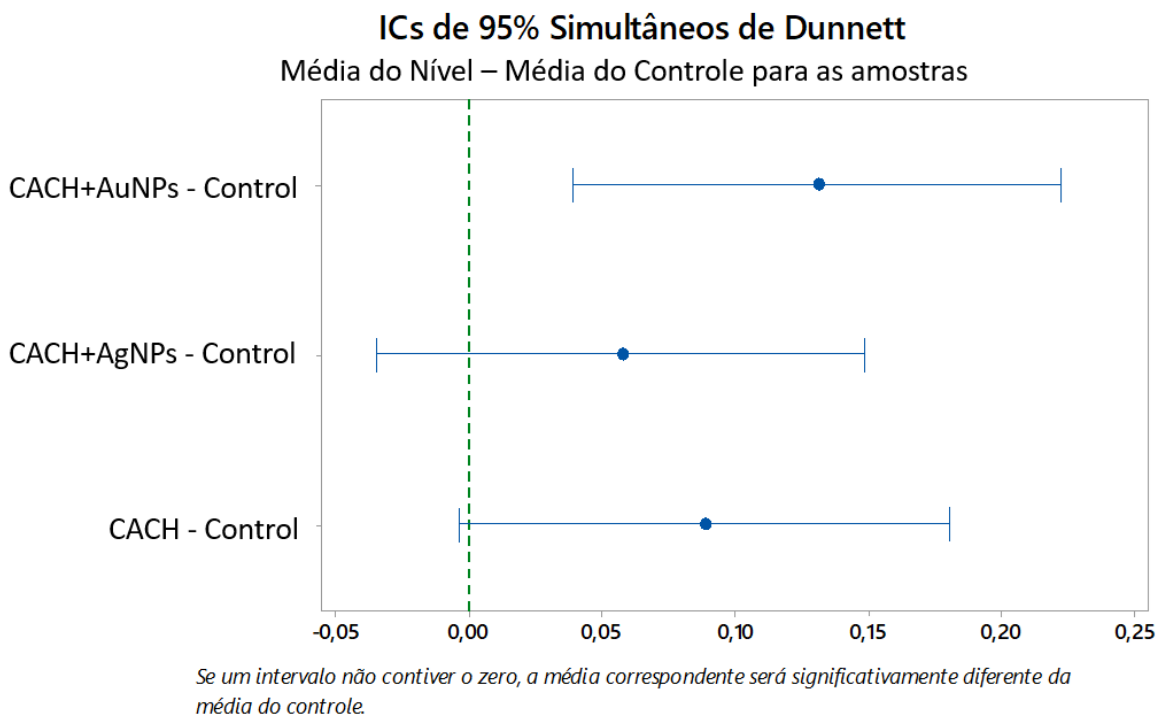
Figura 15 - Análise histológica: a) Quantificação da área óssea neoformada; b) grupo controle; c) grupo CACH; d) grupo CACH + AgNPs e; e) Grupo CACH + AuNPs. A seta vermelha indica regiões de neoformação no tecido ósseo.



Fonte: Autora em Colaboração com a UNESP (2020).

Quando apenas valores médios dos grupos são considerados, constata-se que o grupo controle apresentou o menor valor percentual de neoformação, seguido pelo grupo CACH+AgNPs, CACH e CACH+AuNPs, respectivamente. Dentre os grupos, oCACH+AuNPs apresentou a maior média percentual de neoformação. Entretanto é necessário verificar a significância estatística destes resultados. A figura 16 apresenta os resultados do teste ANOVA one way combinada com o teste de Dunnett, sendo utilizada para comparar a significância estatística dos valores percentuais de neoformação do tecido ósseo.

Figura 16 - Análise ANOVA combinada com teste Dunnett, neoformação nos grupos.



Fonte: Autora (2021)

Os resultados da análise estatística evidenciaram diferença significativa apenas para o grupo CACH+AuNPs, visto que o intervalo não contempla o zero. Nas demais combinações, os grupos não apresentam resultados de neoformação estatisticamente relevantes, quando comparados ao grupo controle. Dessa forma, o compósito CACH+AuNPs foi o que obteve diferença significativa para a neoformação óssea.

Outro ponto importante a ser ressaltado no modelo animal utilizado é o grupo controle. Este grupo representa o processo natural de cicatrização para reparo do osso lesado, sem qualquer cimento ou enxerto ósseo. Após 30 dias, a resposta de reparo ósseo em animais saudáveis é suficiente para reparar toda a extensão superficial (RIMONDINI et al., 2005). Assim, os tipos de cimento devem proporcionar neoformação óssea igual ou maior que o grupo controle, no tempo experimental adotado os animais do grupo controle já estavam recuperados. Assim, a ANOVA unilateral e o teste de Dunnett foram escolhidos com base neste perfil de modelo animal, onde o grupo controle é uma referência muito adequada para resultados de sucesso (BROWN, 2005).

Embora os resultados *in vivo* mostrem neoformação com médias superiores aos grupos controle, sugerindo um resultado positivo para os tipos de aplicações de cimento (Figura 15), o CACH + AuNPs foi o grupo significativo (Figura 16), o que está de acordo com relatos de que nanopartículas de ouro podem ajudar no controle do trajeto do osso (LI et al., 2020). Porém, a adição de nanopartículas de prata no CACH, não trouxe nenhum benefício na melhoria da biocompatibilidade, bem como nas propriedades mecânicas apresentadas.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apontaram que a adição de AuNPs ao cimento de aluminato de cálcio homogêneo melhorou à resistência mecânica à flexão, porosidade e diâmetro de poros. Enquanto a adição de AgNPs não contribuiu para a melhoria das propriedades mecânicas, diminuindo o desempenho do material comparado com o padrão CACH. Por outro lado, o CACH associado aAuNPs ou AgNPs contribuiu para aumentar a bioatividade do cimento de aluminato de cálcio, sendo evidenciada modificação mais evidente da morfologia superficial.

Os resultados das análises *in vitro*, mostrou que todos os grupos experimentais estudados eram elegíveis a aplicação *in vivo*, pois todos os valores de atividade mitocondrial foram acima de 50%. Enquanto que os resultados das análises *in vivo* confirmaram que associação CACH+AgNPs não é benéfica, em termos de propriedade mecânica ou neoformação óssea.

Os resultados convergem que a associação CACH+AuNPs tem potencial de aplicação clínica, melhorando o desempenho do material e aumentando a biocompatibilidade.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, F. G.; et al. Biocompatibility of new calcium aluminate cement (EndoBinder). **Journal of Endodontics**, v. 38, n.3, p.367-371, 2012.
- AJAXON, I.; PERSSON. C. Compressive fatigue properties of an acidic calcium phosphate cement. **J. Mater. Sci: Mater. Med.** v. 28, p. 1-7, 2017.
- AJAXON, Ingrid et al. Fatigue performance of a high-strength, degradable calcium phosphate bone cement. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 79, p. 46-52, 2018.
- AKERS, R. M.; DENBOW, D. M. Bones and Skeletal System. Anatomy & Physiology of Domestic Animals. Iowa: **BlackwellPublishing**. p. 131-168. 2. 2008.
- ALMEIDA, R. S. et al. Regeneração de defeito ósseo crítico após implantação de fosfato de cálcio bifásico (β -fosfato tricálcico/pirofosfato de cálcio) e vidro bioativo fosfatado. **Cerâmica**, v. 66, n. 378, p. 119-125, 2020.
- ALVES, H. L. et al. Influência de Aditivos na injetabilidade de cimento ósseo de fosfato tricálcico. Revista Matéria, v. 11, n. 3, pp. 324 – 331, 2006.
- AMORIM, H. S.; RANGEL, M. DO C. Nanotecnologia: Aspectos Gerais e Potencial de Aplicação em Catálise. **Quim. Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860–1870, 2009.
- AMORIM, Tade-Ane. **Quão seguro é seguro o suficiente? Controvérsias científicas e a construção da idéia da segurança dos nanomedicamentos**. UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- ANDRADE, J. E. **Síntese, caracterização e modificação de nanopartículas de prata com 5-fluorouracil sob a influência do pH**. Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências (Física), 2008.
- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v.35, n.2, p.191-198, 2006.
- BAO, Xiaogang et al. 3D biomimetic artificial bone scaffolds with dual-cytokines spatiotemporal delivery for large weight-bearing bone defect repair. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.
- BAPTISTA, P. et al. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2008.
- BARBARISI, Manlio et al. Use of polycaprolactone (PCL) as scaffolds for the regeneration of nerve tissue. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 5, p. 1755-1760, 2015.

BERWIG, Juliane; ENGELMANN, Wilson. As Nanotecnologias: Das Oportunidades a Prevenção e Precaução Dos Riscos (Nanotechnologies: From Opportunities to Risk Prevention and Precaution). **Berwig, JA**, p. 39-74, 2017.

BONAN, R. F., et. al. Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita. **Cerâmica**, v. 60, p. 402-410, 2014.

BOSE, Susmita; ROY, Mangal; BANDYOPADHYAY, Amit. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends In Biotechnology**, Pallman, v. 30, n. 10, p.546-554, 2012.

BROWN, Angus M. A new software for carrying out one-way ANOVA post hoc tests. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 79, n. 1, p. 89-95, 2005.

BURGER, C. P. Calcium Aluminate Cement – Use in bone defects induced in the femurs of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 3, p.757-762, jun. 2013.

BURGER, C. P.; MORAES, P. C.; et al. Calcium aluminate cement: used in bone defects induced in the femur of rabbits. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, V.65, p. 757-762, 2013.

CAETANO, G. F. **Células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo e fração proteica do látex natural (*Hevea brasiliensis*) associados à scaffolds de policaprolactona e grafeno na osteogênese experimental**. Tese (doutorado em ciências médicas) Departamento de Clínica Médica, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2017.

CAMPOS, W. N. S et al. Synthesis and characterization of gold nanoparticles combined with curcumin and its effects on experimentally induced osteoarthritis. **Ciência Rural**, v. 47, n. 7, 2017.

CANCINO, Juliana; MARANGONI, Valéria S.; ZUCOLOTTO, Valtencir. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.

CARANO, Richard AD; FILVAROFF, Ellen H. Angiogênese e reparo ósseo. **Hoje descoberta de drogas**, v. 8, n. 21, p. 980-989, 2003.

CARMO, S. S et al. Influence of early mineral deposits of silicate-and aluminate-based cements on push-out bond strength to root dentine. **International endodontic journal**, v. 51, n. 1, p. 92-101, 2017.

CASTRO-RAUCCI, L. M. et al. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, p. 99-104, 2011.

CASTRO-RAUCCI, L. M. S et al. Osteogenic cell response to calcium aluminate-based cement. **International endodontic journal**, v. 50, n. 8, p. 771-779, 2017.

CAUSA, F., et al. A multi-functional scaffold for tissue regeneration: the need to engineer a tissue analogue. **Biomaterials**, v. 28, p. 5093-5099, 2007

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE). **Estudo Prospectivo. Materiais Avançados para Saúde Médico-Odontológico 2010-2022**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**. v. 176. 2008.

CROSS, Lauren M. et al. Nanoengineered biomaterials for repair and regeneration of orthopedic tissue interfaces. **Acta biomaterialia**, v. 42, p. 2-17, 2016.

DALTRO, Ana Flávia Calmon et al. Análise comparativa do efeito de dois protocolos de ultrassom terapêutico para regeneração de defeito ósseo crítico. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 55, n. 3, p. 278-283, 2020.

DAVOODI, S. R.; HOSSAYNI, S. M. Role of Motorcycle Running Lights in Reducing Motorcycle Crashes during Daytime; A Review of the Current Literature. **Bulletin of Emergency & Trauma**, v. 3, n. 3, p. 73, 2015.

DEMIRTAŞ, T. T.; KAYNAK, G.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10x SBF-like solution by microwave irradiation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 49, p. 713-719, 2015.

DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran et al. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal Of Polymer Science**. Kawagoe Saitama, v. 2011, p. 1-19. 2011.

EMI, E. T. P. **Caracterização das propriedades mecânicas de osso irradiado, utilizando ensaios destrutivos e não destrutivos**. [Dissertação] Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

ENGQVIST, H. et al. Chemical stability of a novel injectable bioceramic for stabilisation of vertebral compression fractures. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 21, n.2, p.98-106, 2008.

ENGQVIST, H.; et al. Chemical and biological integration of a mouldable bioactive ceramic material capable of forming apatite in vivo in teeth. **Biomaterials**, v. 25, n.14, 2004.

FANG, Ronnie H. et al. Cell membrane-derived nanomaterials for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 128, p. 69-83, 2017.

FILHO, Celso Prata; MIBIELLI, Marco Antônio Naslausky; DE SILOS, Sandro Santos. Epidemiologia das fraturas expostas no hospital das clínicas de

teresópolisconstantinoottaviano (hctco)-rj. **Revista da Faculdade de Medicina de Teresópolis**, v. 2, n. 2, 2018.

FRANCI, Gianluigi et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8856-8874, 2015.

GAO, Chengde et al. Bone biomaterials and interactions with stem cells. **Bone research**, v. 5, n. 1, p. 1-33, 2017.

GERSTENFELD, L. C., et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **J Cell Biochem.** 88(5):873-84. 2003.

GERSTENFELD, L. C., et al. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. **J HistochemCytochem.** 54(11):1215-28. 2006.

GILROY, A. M. **Anatomia – Texto e Atlas.** 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Cap. 1. p. 1-19. 2015.

GRAÇA, Guido Rezende Alencastro. **Efeito da desmineralização óssea nas propriedades mecânicas do tecido cortical ósseo.** 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

GORUP, L. F. **Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com dibutil-dicalcogenetos.** Dissertação de mestrado. São Carlos. SP. 2010.

GUTIERRES, Manuel et al. Substitutos Ósseos: Conceitos Gerais e Estado Actual. **Arqui Med. Porto**, p. 153-162. jul. 2005.

HAMILL, J.; KNUTZEN, K. M.; DERRICK, T. **Biomechanical basis of human movement.**3th. 2008.

HARVEY, E. J.; HENDERSON, J. E.; VENGALLATORE, S. T. Nanotechnology and bone healing. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 24, p. S25-S30, 2010.

HENKEL, Jan et al. Regeneração óssea baseada em concepções de engenharia de tecidos - uma perspectiva do século XXI. **Bonereseach** , v. 1, n. 1, p. 216-248, 2013.

HENN, Sebastian et al. Metaheuristics for the order batching problem in manual order picking systems. **Business Research**, v. 3, n. 1, p. 82-105, 2010.

HOSSEINPOUR, M et al. Trend and Seasonal Patterns of Injuries and Mortality Due to Motorcyclists Traffic Accidents; A Hospital-Based Study. **Bulletin of Emergency & Trauma**, v. 5, n. 1, p. 47, 2017.

ISO, 10993-5, Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, Third edition, 2009.

JABERI, J. et al. Long term clinical outcome analysis of poly-methyl-methacrylate cranioplasty for large skull defects. **J Oral Maxillofac Surgery**, v. 71, p. 81-88. 2013.

JUDAS, Fernando; PALMA, Paulo; FALACHO, Rui Isidro; FIGUEIREDO, Helena. **Estrutura e dinâmica do tecido ósseo**. 2012.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. Tecido Ósseo. In: JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KHANG, D. et al. Nanotechnology for regenerative medicine. **Biomedicalmicrodevices**, v. 12, n. 4, p. 575-587, 2010.

KOMORI, Toshihisa. Roles of Runx2 in skeletal development. **RUNX Proteins in development and cancer**, p. 83-93, 2017.

KOPANDA, J. E.; MACZURA, G. Production processes, properties, and applications for calcium aluminate cements, In: HART, L. D.; LENSE, E. Alumina Chemicals Science and Technology Handbook. New York: **Wiley-American Ceramic Society**, 1990.

KUBINOVÁ, Š.; SYKOVÁ, E. Nanotechnologies in regenerative medicine. **Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies**, v. 19, n. 3, p. 144-156, 2010.

LANDUCI, Michel Cinto. **Caracterização das propriedades mecânicas de biomateriais metálicos**. 2016.

LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, p. 3391-3395, 1982.

LI, Yulin; LIU, Changsheng. Nanomaterial-based bone regeneration. **Nanoscale**, v. 9, n. 15, p. 4862-4874, 2017.

LI, Hongru et al. Avanços na aplicação de nanopartículas de ouro na engenharia de tecidos ósseos. **Jornal de engenharia biológica**, v. 14, p. 1-15, 2020.

LÖÖF, J. **Calcium-aluminate as biomaterial: synthesis, design and evaluation**. Dissertação (mestrado) Acta UnivertitatisUpsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, Uppsala. 2008.

MACHADO, Jéferson Luis de Moraes. **Desenvolvimento de Cimento Ósseo de Fosfato de Cálcio Como Suporte Para o Crescimento de Tecidos**. 2007. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia, Minas, Metalúrgica e Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MACHADO, Laiz Basso. **Avaliação radiográfica da influência do enxerto omental livre autógeno sobre falhas ósseas do terço médio da diáfise do rádio de**

coelhos. 2017. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

MARANGONI, Valeria S.; PAINO, Ieda M.; ZUCOLOTTI, Valtencir. Synthesis and characterization of jacalin-gold nanoparticles conjugated as specific markers for cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 380-386, 2013.

MARQUIS, Marie-Eve et al. Interações células-osso-biomateriais. **Frente Biosci**, v. 14, p. 1023-1067, 2009.

MATHERS, Colin. Loncar; Dejan. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2020. **PLoS Med** 3 (11): e442.

MAZZONETTO, Renato; NETTO, Henrique Duque; NASCIMENTO, Frederico Felipe. Enxertos ósseos em implantodontia. **Nova Odessa**: Napoleão, 2012.

MELO JR., Maurício Alves et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.

MORADI, A et al. Effective environmental factors on geographical distribution of traffic accidents on pedestrians, downtown of Tehran City. **International journal of injury control and safety promotion**, p. 1-5, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUNDSTOCK, K. B. **Obtenção e caracterização de biovitrocerâmicas celulares do sistema Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅**. 2010. 138 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Florianópolis, 2010.

MUNTEANU, P. L et al. Human and environmental factors contributing to fatal road accidents in a Romanian population. **Rom J LegMed**, v. 22, p. 97-100, 2014.

OLIVEIRA, I. R. et al. Improving the radiopacity of calcium aluminate cement based blends. **Materials Research**, v. 21, n. 2, p. 1-11, 2018.

OLIVEIRA, I. R. et al. In vitro apatite-forming ability of calcium aluminate blends. **Ceramics International**, v. 43, n. 13, p. 10071-10079, 2017.

OLIVEIRA, I. R et al. Bioactivity of calcium aluminate endodontic cement. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 6, p. 774-778, 2013.

OLIVEIRA, W. C. et al. Traumas contusões e fraturas. **Vitrine Prod.** v.3 n.2, 2015.

OVALLE, William; NAHIRNEY, Patrick C. Tecidocartilaginoso e tecidoósseo. In: OVALLE, William; NAHIRNEY, Patrick C. **Netter Bases da Histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 6. p. 131-156.

PANSIERI, José Carlos; ESTEVES, Alessandra; JUNIOR, Wagner Costa Rossi. Efeitos de esteróides anabolizantes na regeneração óssea. **Sport Sci**, v. 7, n. 3, p. 88-93, 2019.

PARREIRA, R. M. et al. Calcium aluminate cement-based compositions for biomaterial applications. **Ceramics International**, v. 42, n. 10, p. 11732-11738, 2016.

PEREIRA, E. C. S. Estudo do longitudinal da deficiência estrogênica no fêmur de ratas. Dissertação, Faculdade de odontologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2011.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 38, n. 7, p. 957-971, Aug. 2015.

POMPEU, L. L. M. F. **Aluminatos de cálcio e seu potencial para aplicação em endodontia e ortopedia**. 2011. 65 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Programa de Pós Graduação em Bioengenharia. Universidade do Vale do Paraíba. São Paulo. 2011.

POMPEU, L. L. M. F. et al. Calcium aluminates potential for endodontics and orthopedic applications. **Cerâmica**, v. 59, n. 350, p. 216-224, 2013.

RAZZAGHI, A et al. Assessment of trend and seasonality in road accident data: an Iranian case study. **International journal of health policy and management**, v. 1, n. 1, p. 51, 2013.

RIGO, E. C. S. et al. Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. **Materials Science and Engineering: C**, v. 24, n. 5, p. 647-651, 2004.

RIMONDINI, Lia et al. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 99, n. 2, p. 148-154, 2005.

RODRIGUES, B. V. M et al. Graphene oxide/multi-walled carbon nanotubes as nanofeatured scaffolds for the assisted deposition of nanohydroxyapatite: characterization and biological evaluation. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 2569, 2016.

SEABRA, D. E. A. Studies of bioactivity of zinc oxide nanostructures. **Masters dissertation**. Aveiro University, 2013.

SEBBEN, Alessandra Deise et al. Comparative study on use of platelet-rich plasma alone and in combination with alpha-tricalcium phosphate cement for bone repair in rats. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 47, n. 4, p. 505-512, 2012.

SEO, Seog-jin et al. Strategies for osteochondral repair: Focus on scaffolds. *Journal Of Tissue Engineering*, **Cheonan**, v. 5, p.1-14, 2014.

SILVA, Viviane Viana. Aplicação de biomateriais em ortopedia e engenharia de tecido ósseo. *Revista Saúde e Meio Ambiente–RESMA*, v. 5, p. 14-27, 2017.

SINDHU, K. et al. Curcumin conjugated gold nanoparticle synthesis and its biocompatibility. **Royal Society of Chemistry**, v.4, p.1808-1818, 2014.

SIZÍNIO, H. et al. **Ortopedia e traumatologia: princípios e práticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.

SOARES, Cláudio Beling Gonçalves. **Impacto da radiação ionizante na consolidação de fraturas e efetividade do centrifugado de líquido amniótico humano como fator contribuinte para a cicatrização do tecido ósseo irradiado**. Tese (Doutorado)- Faculdade De Medicina da Universidade Federal De Minas Gerais. Belo Horizonte. 2019.

SOUZA, M.M., et al. Análise da resistência mecânica de 13 cimentos ósseos acrílicos. **RBM Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 27-37, 2010.

TRÉGOUËT, René. As nanotecnologias: novo motor da revolução tecnológica. **Boletim Eletrônico RT Flash Lettre 436**. Junho de 2007.

VALLET-REGÍ, M. Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine. **Journal of internal medicine**, v. 267, n. 1, p. 22-43, 2010.

VASCONCELOS, J. W et al. Avaliação da sinvastatina no processo de consolidação de fraturas em tíbias de ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 48, n. 2, p. 191-195, 2013.

VIEIRA, S.; VIAL, S.; REIS, R. L.; OLIVEIRA, J. M. Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. **Biotechnol. Prog.** 2017.

VIJAYAKUMAR, R. et al. Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using extract of anti-tumor potent *Crocus sativus*. **Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures**, v. 44, n. 3, p. 665-671, 2011.

WERS, E. **Elaboration d'un biomatériau poreux à base d'une matrice vitreuse induisant le phénomène d'ostéoconduction**. 2014. 340 p. Tese (Doutorado em ciências dos materiais) – Instituto de Ciências Químicas de Rennes, Universidade de Rennes, França. 2014.

WILLIAMS, Jessica M. et al. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. **Biomaterials**, Michigan, v. 26, n. 23, p. 4817-4827. Jan. 2005.

ZHANG, Dawei et al. Gold nanoparticles stimulate differentiation and mineralization of primary osteoblasts through the ERK/MAPK signaling pathway. **Materials Science and Engineering: C**, v. 42, p. 70-77, 2014.

ZHANG, Xi-Feng et al. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p.1534-2016.