



LIA SAITO

Estudo da Biocompatibilidade *In-Vitro* e *In-Vivo* de Cimento de [Alfa]-Fosfato Tricálcico: Diferentes Tempos e Processos de Moagem

01/2014

CAMPINAS

2013



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

LIA SAITO

Estudo da Biocompatibilidade In-Vitro e In-Vivo de Cimento de [Alfa]-Fosfato Tricálcico: Diferentes Tempos e Processos de Moagem

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Engenharia Mecânica, na Área de Materiais e Processos de Fabricação.

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA LIA SAITO E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. CECÍLIA
AMÉLIA DE CARVALHO ZAVAGLIA.

ASSINATURA DA ORIENTADORA

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Saito, Lia, 1989-
Sa28e Estudo da biocompatibilidade *in-vitro* e *In-vivo* de cimento de [Alfa]-fosfato
tricálcico : diferentes tempos e processos de moagem / Lia Saito. – Campinas, SP
: [s.n.], 2013.

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Mecânica.

1. Biomateriais. 2. Biocompatibilidade. 3. Cerâmica. 4. Fosfato de cálcio. I.
Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho, 1954-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: In-vitro and in-vivo biocompatibility study of [Alpha]-tricalcium
phosphate cement : Differents times and milling powder processing

Palavras-chave em inglês:

Biomaterials

Biocompatibility

Ceramic

Calcium phosphate

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestra em Engenharia Mecânica

Banca examinadora:

Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia [Orientador]

Marcos Akira d'Ávila

Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Data de defesa: 13-11-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

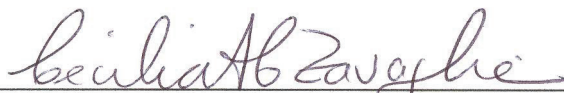
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

Estudo da Biocompatibilidade In-Vitro e In-Vivo de Cimento de [Alfa]-Fosfato Tricálcico: Diferentes Tempos e Processos de Moagem

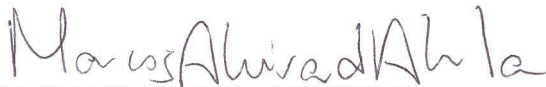
Autora: Lia Saito

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

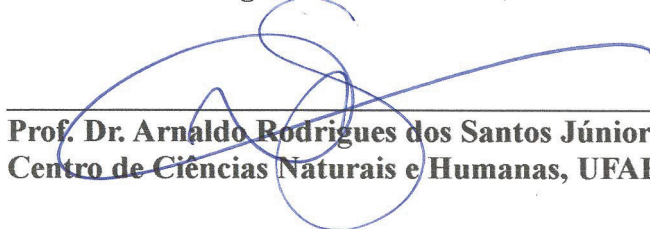
A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Orientadora
Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP, SP



Prof. Dr. Marcos Akira D'Ávila
Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP, SP



Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior
Centro de Ciências Naturais e Humanas, UFABC, SP

Campinas, 13 de novembro de 2013.

Aos meus pais, Lauro e Luzia.

E à minha irmã Suzane.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, pela oportunidade e orientação.

Ao Mestre Hugo Cardoso, pela enorme paciência em me ensinar e pela grande amizade.

À Profa. Dra. Mariana Motisuke, por toda sua colaboração, conhecimento e auxílio nas dificuldades.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Maria Alice Hofling e sua equipe, em especial à aluna de mestrado Edilene Siqueira Soares, que me ajudaram e possibilitaram a realizar os experimentos *in vivo*.

Ao pesquisador João Ernesto e sua equipe que foram essenciais na realização dos testes de citotoxicidade.

À Profa. Dra. Ana Paula Davel, por disponibilizar seu biotério.

Ao Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran e seu laboratório, pelas análises de fluorescência de raios-X.

Ao INCT-Biofabris pela realização das análises de área superficial das amostras.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV, Jeol 5900LV.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Materiais, que sempre estiveram à disposição.

Aos colegas do Labiomec: Guinea, Dani, Leo, Geraldine, Lola e Felipe.

Aos meus amigos biólogos que tanto admiro: Érica, Edilene, Nati Tavares, Nati Moraes, Conrado, Vicky e Camila.

Aos meus amigos de colégio que sempre estiveram presentes, mesmo longe: Murilo, Fábio, Nati, Stephanie, Renata, Thaís, Marcelo, Raphael, Virgínia.

Ao Thiago, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

À minha irmã e melhor amiga, Suzane que sempre esteve ao meu lado.

À minha mãe, Luzia, a pessoa mais forte e corajosa que conheço.

Ao meu pai, Lauro, uma das pessoas que mais admiro e sempre me incentivou.

“Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa.”

Guimarães Rosa

Resumo

A necessidade de substituintes ósseos está crescendo rapidamente no campo da cirurgia reconstrutiva. Os cimentos à base de fosfato de cálcio são largamente empregados no reparo do tecido ósseo devido a uma série de propriedades atrativas, como excelente bioatividade e biocompatibilidade. São muitos os estudos feitos em busca da otimização das propriedades desses materiais ou a análise do comportamento biológico desses substitutos, entretanto esses estudos analisam essas propriedades isoladamente, sem se atentar para que as duas variáveis devem ser analisadas simultaneamente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da distribuição granulométrica do pó de α -TCP no comportamento biológico do cimento ósseo que utiliza este pó precursor através de uma análise simultânea de propriedades físico-químicas, mecânicas e morfológicas e do comportamento biológico do material. Para isso, o pó de α -TCP foi obtido em laboratório a fim de se alcançar elevada pureza de fase. Este mesmo pó passou por diferentes protocolos de moagem a fim de se obter duas faixas de distribuição granulométrica. Finalmente, os cimentos que apresentaram potencial para aplicação como implantes de acordo com as caracterizações prévias do material passaram por avaliação das suas propriedades biológicas através de testes *in-vitro* e *in-vivo*. Ambos as amostras apresentaram pureza de fase, livres de contaminações. Além disso, obtiveram valores de resistências mecânicas semelhantes ou maiores do que consta na literatura e resultados positivos em relação à biocompatibilidade.

Palavras Chave: Biomateriais, Biocerâmica, Fosfato de Cálcio, Ensaio Biológicos.

Abstract

Bone substitutes are largely used in reconstructive medicine, especially calcium phosphate cements to repair bone tissue due to its attractive properties as excellent bioactivity and biocompatibility. There are several studies about the increase of these materials' properties or the analysis of biological behavior from these substitutes, however the researches only show the properties separately, instead of analyze the two variables simultaneously. The aim of this project was to analyze the influence of two different particle size distribution of α -TCP powder on biological behavior of its bone cement through simultaneous analysis of physical-chemical, mechanical and morphological properties and biological behavior of the material. Thus, α -TCP powder was obtained in laboratory to reach the maximum purity level. The same powder was processed by different milling protocols to obtain two distinct ranges of particle size distribution. Finally, the cements that presented high potential application as implants from its characterization methods were evaluated by *in vitro* and *in vivo* essays. Both samples presented phase purity without contamination, mechanical resistance similar or superior than described on literature and positive results in biocompatibility tests.

Key words: Biomaterials, Bioceramic, Calcium phosphate, Biological essays.

Lista de Ilustrações

Figura 2.1 Representação das aplicações clínicas das biocerâmicas relacionados com cada parte do corpo humano.

Figura 3.1 Organograma da metodologia utilizada durante o projeto.

Figura 3.2 Foto do equipamento do moinho de bolas horizontal.

Figura 3.3 Foto do equipamento do moinho de alta energia.

Figura 3.4 Foto dos corpos de prova para fabricação do cimento de α -TCP.

Figura 4.1 Difratoograma de raios-X da amostra do pó de α -TCP e das amostras após a moagem.

Figura 4.2 Difratoograma de raios-X dos cimentos das amostras MH e AE.

Figura 4.3 Micrografias do pó de α -TCP.

Figura 4.4 Micrografias das amostras MH e AE, após os processos de moagem.

Figura 4.5 Micrografias dos cimentos das amostras MH e AE.

Figura 4.6 Distribuição granulométrica da amostra MH.

Figura 4.7 Distribuição granulométrica da amostra AE.

Figura 4.8 Boxplot da tensão das amostras MH e AE.

Figura 4.9 Resultados do teste de citotoxicidade do controle positivo, doxorrubicina.

Figura 4.10 Resultados do teste de citotoxicidade da amostra MH.

Figura 4.11 Resultados do teste de citotoxicidade da amostra AE.

Figura 4.12 Histologia dos rins dos animais controle (C), com implante de cimento MH (MH), com implante de cimento AE (AE). A – região do córtex renal, B – região da medula renal.

Figura 4.13 Histologia dos fígados dos animais controle (C), com implante de cimento MH (MH) e com implante de cimento AE (AE).

Figura 4.14 Histologia dos cérebros dos animais controle (C), com implante de cimento MH (MH) e com implante de cimento AE (AE).

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 Linhagens celulares humanas empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Tabela 4.1 Fluorescência de raios-X dos elementos minoritários das amostras do pó de α -TCP, MH e AE.

Tabela 4.2 Parâmetros de tamanho de partícula das amostras MH e AE.

Tabela 4.3 Valores da área superficial específica pelo método BET, das amostras MH e AE.

Tabela 4.4 Valores da média e desvio-padrão dos limites de resistência à compressão axial, das amostras MH e AE.

Lista de Abreviaturas e Siglas

Letras Latinas

°C – graus Celsius

cm³ – centímetro cúbico

g – grama

h – hora

kg – quilograma

kV – quilovolt

mA – miliampère

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

m² – metro quadrado

µg – micrograma

µL – microlitro

µm – micrômetro

µM – micromolar

M – molar

MPa – megapascal

nm – nanometro

® - marca registrada

rpm – rotações por minuto

.....

Letras Gregas

α – fase alfa do fosfato tricálcico

β – fase beta do fosfato tricálcico

θ – ângulo, em graus

.....

Abreviaturas e Siglas

Al – alumínio

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – [alfa]-fosfato tricálcico

$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ – hidroxiapatita deficiente em cálcio

CaCO_3 – carbonato de cálcio

CaHPO_4 – hidrogenofosfato de cálcio ou monetita

CO_2 – gás carbônico

Cr – cromo

Fe – ferro

H_2O – água

Na – sódio

Na_2HPO_4 – hidrogeno fosfato de sódio

Si – silício

Sr – estrôncio

AE – amostra que passou pelo processo de moagem por moinho de alta energia

ANOVA – análise de variância

BET – analisador de área superficial

CDHA – hidroxiapatita deficiente em cálcio

DMSO – dimetilsulfóxido

DRX – difração de raios-X

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ESB – Sociedade Européia de Biomateriais

FRX – fluorescência de raios-X

GI – growth inhibition

IC50% – índice de citotoxicidade 50%

JCPDS – Joint Committee on Powder Diffraction Standards

LC – lethal concentration

MEV – microscópio eletrônico de varredura

MH – amostra que passou pelo processo de moagem por moinho de bolas horizontal

PBS – tampão fosfato salino

pH – potencial hidrogeniônico

RPMI – meio de cultura para crescimento celular

SBR – sulforrodamina B

SFB – soro fetal bovino

T – placa com células tratadas

T0 – placa controle

T1 – placa com células

TCA – ácido tricloroacético

TCP – fosfato tricálcico

TGI – total growth inhibition

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Biomateriais	3
2.2 Tecido ósseo	6
2.3 Biocerâmicas.....	8
2.4 Alfa-fosfato tricálcico	10
2.5 Objetivos	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Síntese de Reagentes e α -TCP	14
3.2 Moagem do pó de α -TCP.....	14
3.3 Preparação do cimento de α -TCP.....	16
3.4 Caracterizações	18
3.5 Ensaios biológicos	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Difração de Raios-X.....	24
4.2 Fluorescência de Raios-X.....	25
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	26
4.4 Distribuição Granulométrica.....	30
4.5 Ensaio de Resistência Mecânica	32
4.6 Teste de Citotoxicidade	34
4.7 Histologia	37
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	42
5.1 Conclusões	42
5.2 Sugestões para próximos trabalhos.....	42
Referências	43
ANEXO A.....	50

1 INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos, o homem utiliza materiais com a finalidade de substituir os tecidos que foram de alguma forma danificados. Em 1972, por exemplo, foram descobertos crânios pertencentes à época da civilização Maia, de cerca de 4000 anos atrás, nos quais alguns dentes foram substituídos por madrepérola, composto por 95-98% de carbonato de cálcio e 2-5% de matéria orgânica (Chevalier, 2009). Assim, ao longo dos anos, houve grande desenvolvimento tecnológico a fim de se aprimorar cada vez mais o que chamamos hoje de biomateriais.

Várias definições do termo biomateriais foram propostas, como por exemplo, um material sintético usado para substituir parte do organismo, para funcionar em íntimo contato com os tecidos do corpo. A mais aceita das definições de biomateriais é: substâncias ou conjunto de substâncias de origem sintética ou natural que em contato com os tecidos, o sangue e outros fluidos corporais não causam reações adversas ao organismo ou seus componentes, por tempo indeterminado (Willians, 1987).

Dentre os tipos de biomateriais utilizados como substituintes ósseos, as biocerâmicas recebem grande destaque por suas propriedades mecânicas e biológicas. Destacam-se as compostas por fosfato de cálcio, um dos importantes constituintes inorgânicos dos processos de calcificação natural ou patológico que ocorrem em muitos seres vivos (Dorozhkin, 2002). Sua estabilidade, reatividade, degradabilidade, propriedades mecânicas e desempenho biológico dependem diretamente da proporção de cálcio e fósforo (Liu, 2008). Por serem muito semelhantes a fase inorgânica do osso humano pela sua composição, apresentam excelente biocompatibilidade por se ligar diretamente ao osso (Al-Munajjed, 2009).

Há uma grande variedade de sistemas de fosfato de cálcio, porém os sistemas baseados no [alfa]-fosfato tricálcico (α -TCP) apresentam ótimos resultados, pois durante sua reação com meio aquoso há a formação de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), similar a hidroxiapatita óssea, com excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteointegrabilidade. A CDHA favorece o crescimento ósseo por osteocondução: em que ocorre o estabelecimento de um modelo de ambiente apropriado, sobre o qual células osteoprogenitoras, quando estimuladas apropriadamente, podem produzir osso (Heppenstall, 1980).

Entretanto, os estudos geralmente apontam para o controle das propriedades mecânicas ou apenas para o comportamento biológico, sem se atentar para que as duas variáveis devem ser analisadas simultaneamente. Saijo, por exemplo, aplicou cimento de α -TCP em próteses bucomaxilofaciais em dez pacientes humanos obtendo resultados positivos no desempenho biológico dos cimentos (Saijo, 2009), porém um estudo das propriedades mecânicas retornaria uma análise mais completa do desempenho do material. Desse modo, os ensaios *in vitro* e *in vivo* são de extrema importância para estudar a biocompatibilidade dos materiais para sua aplicação em conjunto com o aperfeiçoamento mecânico do material.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biomateriais

Na primeira Conferência de Biomateriais da Sociedade Européia (ESB) em 1976, o termo biomaterial foi definido como “material utilizado como dispositivo médico, projetado para interagir com sistemas biológicos”. Contudo, a atual definição dada pela ESB é “material projetado para promover uma interface com sistemas biológicos para avaliar, tratar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo”. Esta sutil mudança na definição é indicativo de como a área de biomateriais evoluiu, de somente interagir com o organismo para influenciar processos biológicos (O’Brien, 2011).

Atualmente, a definição mais aceita de biomateriais é: substâncias ou conjunto de substâncias de origem sintética ou natural que em contato com os tecidos, o sangue e outros fluidos corporais não causam reações adversas ao organismo ou seus componentes, por tempo indeterminado (Willians, 1987).

Assim, como definições complementares para se entender as características essenciais para um biomaterial, é necessário analisar sua biocompatibilidade e biofuncionalidade.

Em termos de definição, biocompatibilidade é a capacidade que o material e seus possíveis produtos de degradação possuem de ser tolerados pelo organismo sem causar prejuízos a curto e longo prazo. Biofuncionalidade é a capacidade que o material tem de desempenhar a função para a qual foi projetado com êxito pelo período necessário na parte do corpo substituída (Santos, 2002b).

A pesquisa na área de biomateriais requer conhecimento em diferentes áreas para que o material implantado em um organismo vivo tenha uma performance adequada. Tal disciplina é fundada em conhecimentos em ciência dos materiais e da biomedicina, com o objetivo principal de atingir a correta interação entre o material e o paciente (Vallet-Regí, 2010).

Biomateriais são uma parte importante dos cerca de 300 mil produtos designados para uso na área da saúde. Em 2000, o mercado mundial de biomateriais foi estimado em 23 bilhões de dólares. Os maiores gastos são com a área cardiovascular, seguido pela ortopedia. (Soares, 2005).

Ao focar em biomateriais artificiais e funcionais, a escolha é feita entre cerâmicas, metais e polímeros. Cada grupo exhibe suas vantagens e desvantagens. Cerâmicas, por exemplo, sob alguns aspectos, são os materiais que apresentam maior biocompatibilidade e pode ser obtido propriedades como bioestabilidade, atividade e reabsorção. Contudo, apesar de apresentarem alta dureza, são materiais muito frágeis. Os metais apresentam problemas de corrosão e toxicidade, mas sua resistência mecânica atinge níveis ótimos. Polímeros oferecem inúmeras possibilidades que dependem de sua composição e estrutura química, porém poucos apresentam propriedades bioativas (Vallet-Regí, 2010).

A seleção do material é determinada pela aplicação específica de cada biomaterial. Por exemplo, para aplicações de contato com o sangue, estes materiais são componentes de dispositivos extracorpóreos que remove e retorna sangue ao corpo, que podem ser inseridos em um vaso sanguíneo ou implantados permanentemente. Para aplicação em tecidos conjuntivos ou epiteliais, os materiais são implantados nesses tecidos para desenvolver ou redefini-lo. Já para aplicação ortopédica e odontológica, os materiais são componentes de implantes estruturais ou utilizados para reparar danos ósseos (Nascimento, 2007).

Uma das recentes inovações da medicina foi a aplicação dos biomateriais no processo de reparo do tecido ósseo. Neste campo, as próteses ósseas tem grande importância e utilização na medicina ortopédica. Seu desenvolvimento e pesquisas na área procuram, cada vez mais, otimizar tanto suas propriedades mecânicas quanto seu desempenho biológico.

Com o envelhecimento da população e o aumento da expectativa de vida, há uma grande demanda por enxertos ósseos e/ou materiais sintéticos com potencial para substituir ou regenerar o tecido ósseo perdido ou danificado (Tampieri 2005).

Os ossos são o segundo material mais transplantado no corpo humano, perdendo apenas para o sangue. A perda de osso causada por defeitos congênitos, trauma ou após ressecção tumoral é um dos maiores problemas clínicos relacionados à cirurgia cranial (Rotter, 2005).

Há 450 mil procedimentos de enxertos ósseos nos Estados Unidos e 2,2 milhões em escala global, anualmente. Contudo, apenas 10% destes procedimentos utilizam materiais sintéticos,

pois os enxertos sintéticos aprovados são considerados inferiores em relação aos enxertos autógenos e alogênicos (Lewandrowski et al., 2000).

Os enxertos autógenos são coletados do próprio paciente, como cartilagem, osso e vários tecidos moles. Tem como grande vantagem o baixo risco de induzir uma resposta imune e evitar contaminação viral (Brenner e Hilger, 2009). Há limitações em seu uso por fatores como morbidez local do paciente e quantidade de material disponível, porém possuem a melhor resposta clínica em termos de neoformação do tecido ósseo por apresentar propriedades como osteocondução, osteoindução e osteogênese, três elementos que proporcionam o crescimento ósseo. (Boeckel et al., 2012). Osteocondução é o fornecimento de estrutura física e superfícies que favoreçam a migração celular, como células da linhagem mesenquimal. Osteoindução é a habilidade do enxerto em permitir o recrutamento de células-tronco mesenquimais. E por fim, osteogênese é a síntese de tecido ósseo a partir de células que sobrevivem juntamente com o enxerto (Kurien et al, 2013).

Os enxertos alogênicos são retirados de indivíduos da mesma espécie, porém com genótipo diferente do paciente. Desse modo, tais enxertos podem passar por diferentes processos industriais antes de ser implantado no paciente, como aplicação de antibióticos, lavagem ultrasônica e métodos de descontaminação que podem afetar negativamente as propriedades mecânicas e/ou biológicas (Boeckel et al, 2012).

Recentemente, a utilização de enxertos aloplásticos tornou-se mais popular, são considerados nesta categoria os materiais de origem sintética. Devido a sua facilidade no uso, fornecimento ilimitado, facilidade na moldagem de sua forma e a ausência da morbidez local do paciente, este tipo de enxerto é indicado para inúmeros procedimentos cirúrgicos. Contudo, como principal desvantagem há a ativação de resposta inflamatória no local da implantação (Brenner e Hilger, 2009).

A grande variedade de materiais utilizados como substituintes ósseos pode ser explicada pelo fato de que nenhum destes materiais consegue unir três critérios essenciais (Bohner et al, 2012):

1. Ter propriedades mecânicas melhores que os ossos corticais (propriedade “load-bearing”);
2. Ser biorreabsorvível para prevenir fraturas por fadiga em longos períodos de implantação;

3. Promover formação óssea – osteoindução.

Apesar do grande investimento em pesquisas na área, a comunidade científica ainda busca por substituintes ósseos mais adequados.

2.2 Tecido ósseo

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue. Proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular (Junqueira e Carneiro, 2004).

O osso é um tecido conjuntivo rígido, inflexível, no qual a matriz extracelular foi impregnada com sais de cálcio e fosfato por um processo chamado de mineralização. E se caracteriza por ser um tecido altamente vascularizado e metabolicamente ativo (Kierszenbaum, 2002). É um material compósito poroso, que consiste em uma fase orgânica e uma fase mineral. A fase orgânica compreende aproximadamente 35% do total da massa óssea, em que 90% é representada por uma matrix colágena e o restante por proteínas, lipídios e células. A fase mineral é composta, principalmente, por cálcio e fósforo na forma de cristais de hidroxiapatita e representa, aproximadamente, 25% do volume total ósseo e 50% da massa óssea (McNamara, 2011).

Existem dois tipos de ossos: compacto e esponjoso. As diferenças entre estes tipos dependem da quantidade relativa de substância sólida e da quantidade e do tamanho dos espaços que eles contêm. Se a porosidade é baixa (5 a 30%) do volume do osso ocupado por tecido não mineralizado, o tecido é denominado cortical. O tecido ósseo com porosidade relativamente alta, 30% a mais de 90% do volume de osso ocupado por tecido não mineralizado, é denominado como esponjoso. A maioria dos ossos do corpo humano tem as camadas externas compostas de osso cortical e com tecido esponjoso subjacente a este (Hall, 1991).

Quanto à sua forma, existem: os ossos longos, nos quais há predominância do comprimento e estão representados pelo fêmur, úmero, rádio, tíbia, etc. Há os ossos curtos que apresentam três dimensões semelhantes e estão representados pelos ossos do carpo e tarso. Os ossos planos, caracterizados pelo osso do quadril e alguns ossos do crânio. Os ossos sesamóides que se desenvolvem dentro de tendões, como a patela. E os osso irregulares representados pelas vértebras da coluna.

Sendo assim, a organização e composição do esqueleto humano, um sistema mecânico otimizado, reflete sua função: transmissão de força e estabilidade ao corpo humano, e apoio mecânico, proteção, locomoção e participação no metabolismo associado à homeostase mineral (Jiang et al. 1999). Para isso é necessário que o tecido ósseo apresente resistência mecânica variável de acordo com cada função exercida.

A densidade mineral óssea (60-80%) é o principal determinante da resistência mecânica óssea, representado pelos componentes inorgânicos (Cortet e Marchandise, 2001). Já os componentes orgânicos são responsáveis pelo módulo de elasticidade do tecido ósseo. O conjunto desses fatores auxilia o tecido ósseo a responder adequadamente a diversos tipos de solicitações, tais como forças de compressão, tração, flexão, torção, entre outras. Em relação ao limite de resistência mecânica à compressão, diferentes tipos de ossos apresentam distintos valores, o osso cortical apresenta valores entre 100-230 MPa e osso trabecular (ou esponjoso) entre 2-12 MPa (Hench e Wilson, 1993). O osso cortical representa 80% do esqueleto humano e é a parte mais densa e compacta. Sua função está relacionada com a manutenção de sua estrutura rígida e pode ser encontrada nas camadas externas dos ossos, como nas diáfises dos ossos longos. Já o osso trabecular, responsável por 20% do esqueleto, se encontra no interior dos ossos e possui pequenas pontes denominadas de trabéculas. Sua função está relacionada com a manutenção da força do esqueleto, além de alojar a medula óssea. Pode ser encontrado no interior de vértebras, crânio e extremidade de ossos longos.

Outra propriedade importante do tecido ósseo é a sua capacidade única de reparo interno para se regenerar e remodelar (Bran et al. 2008). O tecido ósseo apresenta dois tipos de ossificação: intramembranosa e endocondral.

A ossificação intramembranosa ocorre no interior de membranas do tecido conjuntivo. É o processo formador de ossos frontal, parietal e de partes do occipital, do temporal e dos maxilares superior e inferior. Contribui também para o crescimento dos ossos curtos e para o crescimento

em espessura dos ossos longos. Já a ossificação endocondral tem início sobre uma peça de cartilagem hialina, de forma parecida à do osso que se vai formar, porém de tamanho menor. Este tipo de ossificação é o principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos. (Junqueira e Carneiro, 2004).

Quanto à sua remodelação, o crescimento dos ossos consiste na formação de tecido ósseo novo, associada à reabsorção parcial de tecido já formado; deste modo, os ossos conseguem manter sua forma enquanto crescem. Apesar da sua resistência às pressões e da sua dureza, o tecido ósseo é muito plástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças a que está submetido (Junqueira e Carneiro, 2004).

2.3 Biocerâmicas

Caracterizada por ser um material inorgânico formado por elementos metálicos e não-metálicos com predomínio de combinação de ligações iônicas e covalentes ou totalmente iônicas. (Callister, 1991).

Os materiais cerâmicos são normalmente muito duros, insolúveis em água e estáveis a corrosão e a altas temperaturas. Essas características são a razão de sua importância. Embora muitas cerâmicas tendam a ser quebradiças, elas podem ser usadas em temperaturas altas sem enfraquecer, e resistem a deformação (Atkins e Jones, 2012).

Durante os últimos 40 anos, ocorreu uma revolução no uso das cerâmicas: o desenvolvimento de cerâmicas, designadas de ‘biocerâmicas’, fabricadas e projetadas para serem utilizadas no corpo humano para reparar e reconstruir suas partes desgastadas e danificadas (Perry, 2003).

Na medicina reparativa, as biocerâmicas apresentam alto desempenho por apresentar propriedades, tais como:

- Não citotóxico;
- Não carcinogênico;
- Não induz resposta inflamatória;
- Alta biocompatibilidade;

- Alta biofuncionalidade. (Wong e Bronzino, 2007).

As cerâmicas podem ser divididas em bioinertes e bioativas, dependendo de sua interação com o tecido do organismo ao qual foi implantado. A característica comum em todas as cerâmicas bioativas é a modificação na superfície que ocorre após o implante. A camada biologicamente ativa de apatita-carbonato-hidroxila que é formada na superfície destas biocerâmicas é química e estruturalmente equivalente à fase mineral óssea, que oferece a ligação dessa interface com o osso. Adicionalmente, as cerâmicas bioativas podem ser divididas em reabsorvíveis ou não-reabsorvíveis (Manzano e Vallet-Regi, 2012).

Na Figura 2.1 (Perry, 2003) podem ser observadas as mais diversas aplicações das cerâmicas junto com outros materiais utilizados.

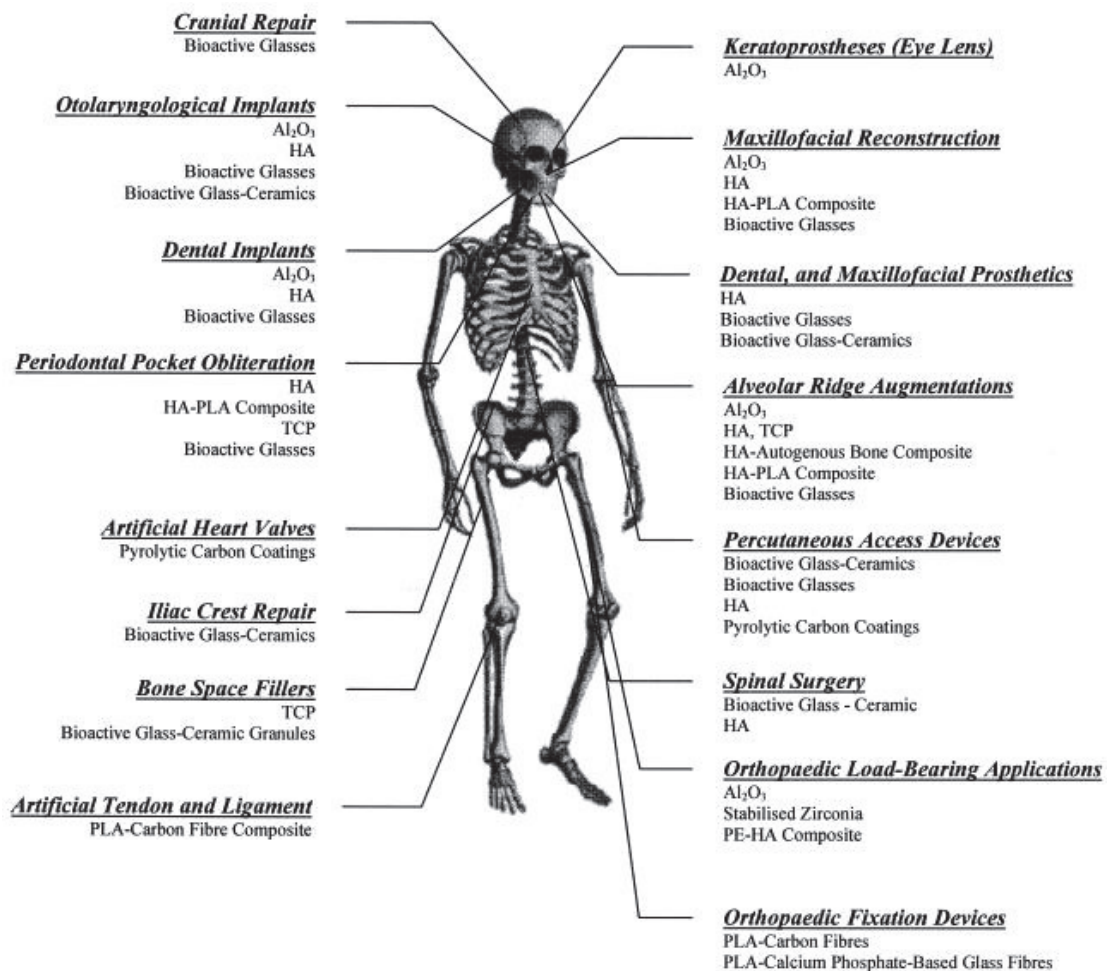


Figura 2.1. Uso clínico das biocerâmicas no corpo humano (Perry, 2003).

Quanto à sua composição química, as biocerâmicas de fosfato de cálcio apresentam alta similaridade com a fase mineral óssea e, portanto, altamente recomendadas para a utilização como substituintes ósseos. Como principais cerâmicas utilizadas para este fim temos: α -fosfato tricálcico (α -TCP), β -fosfato tricálcico (β -TCP), hidroxiapatita, entre outras.

A hidroxiapatita apresenta alta cristalinidade e estabilidade química, e por isso é pouco absorvida e dissolvida por células multinucleares ou por fluidos corporais. Além disso, é pouco substituída por tecido ósseo recém-formado (Yamada et al, 2001).

Apesar dos polimorfos α - e β -TCP terem a mesma composição química, estes diferem, consideravelmente, na sua estrutura, densidade e solubilidade, que determinam suas propriedades biológicas e aplicações clínicas (Carrodeguas e De Aza, 2011).

2.4 Alfa-fosfato tricálcico

Os sistemas baseados no α -fosfato tricálcico (α -TCP) apresentam grandes vantagens em relação a outras biocerâmicas de fosfato de cálcio, por apresentar, após reação de hidrólise, a formação de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), muito semelhante à fase mineral óssea. Já a fase de β -TCP se converte em brushita, o que torna o implante menos eficiente (Cardoso, 2010). A parte inorgânica dos ossos e dentes humano tem similaridade química e estrutural com grande parte que contém CDHA, que possui razão molar Ca/P entre 1,5 e 1,67 (Kim e Kim, 2012).

Além disso, a sinterização de biocerâmicas de β -TCP dificulta a obtenção de altas densidades, já que requer alta temperatura e a sinterização acima de 1180°C induz a transformação de fase de β -TCP para seu outro polimorfo, α -TCP (Choi, 2007). Alguns produtos de síntese podem conter magnésio, que estabiliza a fase de β -TCP, o que torna necessário o aumento da temperatura de calcinação para a obtenção de α -TCP de elevada pureza e mesmo muitas vezes é impossível a síntese do α -TCP. Logo a presença de magnésio é indesejável nos reagentes precursores de α -TCP. (Motisuke et al., 2008).

Estudos *in vivo* mostram que o α -TCP implantado possui maior taxa de biodegradação no organismo, em relação à fase de β -TCP. Suas partículas residuais, cercadas pela neoformação óssea, decrescem ao longo do tempo e são absorvidos pelos osteoclastos (Yamada et al., 2006).

Apesar do progresso dos últimos 20 anos, o mecanismo de ação da osteoindução das cerâmicas de fosfato de cálcio não está esclarecido, parcialmente devido a limitações associadas com os modelos *in vitro* e *in vivo* existentes. Modelos pré-clínicos com animais maiores como ovelha, cachorros e cabritos são mais utilizados do que os modelos com animais menores, dado que a osteoindução pelas cerâmicas de fosfato de cálcio em camundongos e ratos é considerado um evento esporádico (Barradas et al., 2011).

No entanto, um modelo animal que utiliza ratos pode ser preferível já que os animais maiores gastam maior recurso financeiro e requer cirurgias especializadas. Além disso, o uso de ratos pode acelerar a pesquisa devido ao acesso a uma grande variedade de linhagens disponíveis e maiores chances de se utilizar ferramentas complementares como análises funcionais na avaliação de drogas ou anticorpos para caracterização tecidual (Barradas et al., 2012).

Apesar dos inúmeros estudos *in vivo*, na literatura há poucas informações sobre testes de biocompatibilidade *in vitro*. A correlação entre os produtos da reação de pega em diferentes tempos e sua citotoxicidade ainda é pouco esclarecida. Testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, como a habilidade de um composto em causar morte celular como consequência do dano causado às suas funções básicas celulares (Eisenbrand et al., 2002).

Por exemplo, o equilíbrio químico entre a superfície de contato do biomaterial e o meio de cultura celular é altamente dependente da composição química das fases líquida e sólida. Resultados sugerem que as funções celulares são, significativamente, afetadas pela estrutura superficial e composição química das cerâmicas, enquanto a adesão celular nestas aumenta ao modificar sua superfície com proteínas, fibronectina e colágeno (Suzuki et al. 1997).

Ensaio *in vitro* podem não representar o efeito real do implante, porém proporciona rápidos resultados em relação à interação do material em meios biológicos e auxilia na redução do número de animais utilizados (Santos, 2002a).

Assim, estudos recentes têm dado importância à estrutura micro e nanoestrutural dos materiais em relação aos fenômenos biológicos, como adsorção de proteínas ou adesão celular, relevante para otimizar as respostas *in vivo* dos materiais.

A presença de microporos, junto aos macroporos, é necessária para que o material seja osteoindutor. Provavelmente, a introdução da microporosidade, com consequente aumento na área superficial, afeta a dinâmica da interface cerâmica de modo que isso se torna relevante para a diferenciação celular nas linhagens osteogênicas (Habibovic et al., 2005). A macroporosidade (poros maiores que 50 μ m) contribui para a osteogênese ao facilitar o transporte celular e iônico, ou seja, menos material para ser reabsorvido e substituído pelo tecido ósseo (Bignon et al., 2003).

Resultados obtidos mostram que o tamanho de partícula modifica significativamente as propriedades finais do cimento, como cinética da reação química e consolidação mecânica (Ginebra et al., 2004). A reatividade e a resistência mecânica do α -TCP são igualmente influenciadas pelo tamanho de partícula e cristalinidade (Camiré et al., 2006; Urban et al., 2004). Portanto, o controle da distribuição granulométrica do material é de extrema importância para que haja a otimização concomitante das propriedades mecânicas do material e do comportamento biológico do mesmo.

2.5 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é avaliar a influência da distribuição granulométrica do pó de α -TCP no comportamento biológico e nas propriedades finais do cimento ósseo que utiliza este pó precursor. Para isso, objetivos auxiliares são propostos, tais como:

- Obtenção de reagentes precursores do pó de α -TCP livres de magnésio a fim de se obter pó de α -TCP de pureza elevada;
- Moagem do pó de α -TCP sob diferentes tempos e processos de moagem a fim de se obter uma faixa representativa de distribuição de tamanho de partículas;
- Caracterização das propriedades físico-químicas e mecânicas do material a fim de se obter cimentos de alto desempenho;
- Ensaios biológicos *in vivo* e *in vitro* dos cimentos com as melhores formulações.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto seguiu as etapas propostas de acordo com o organograma apresentado na Figura 3.1:

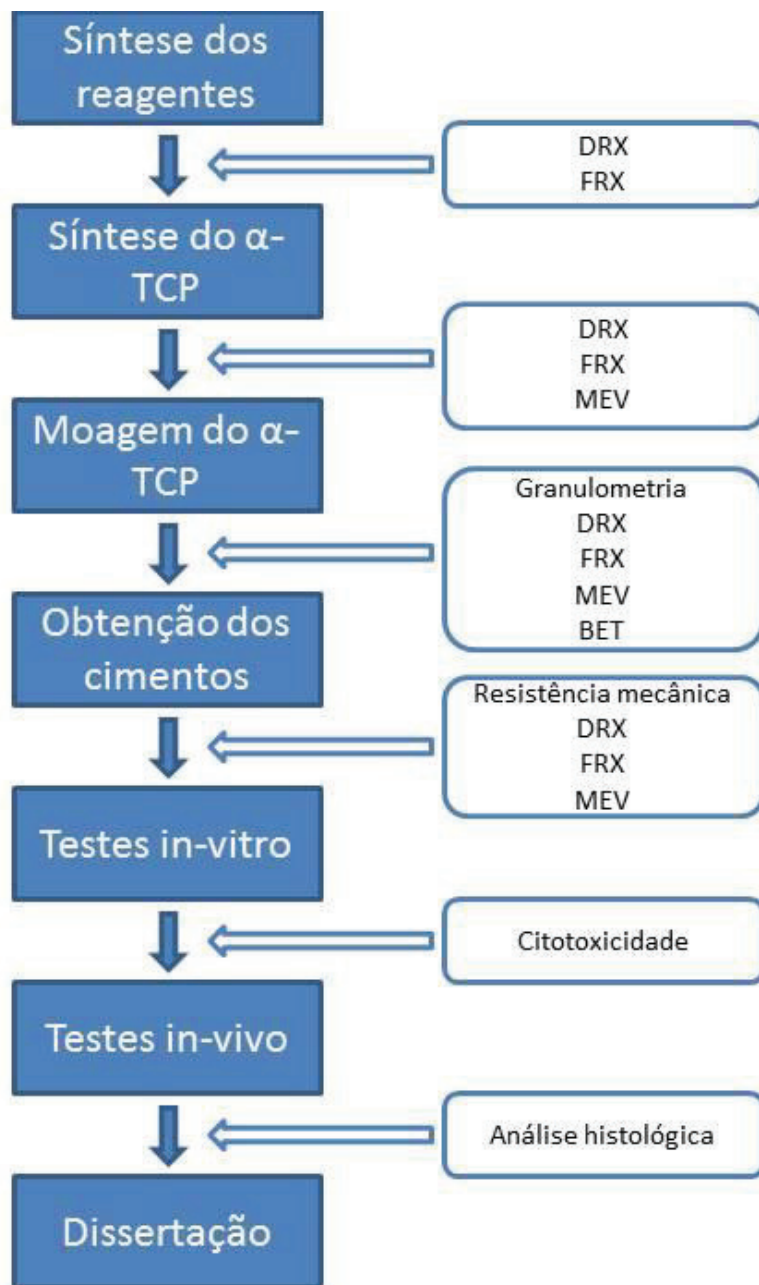


Figura 3.1. Organograma das atividades.

3.1 Síntese de Reagentes e α -TCP

Os reagentes precursores, carbonato de cálcio (CaCO_3) e hidrogenofosfato de cálcio ou monetita (CaHPO_4), foram obtidos em laboratório via precipitação em solução aquosa em que o EDTA sal dissódico foi utilizado como agente sequestrante de magnésio (Motisuke, 2008). Os reagentes foram fabricados com a finalidade de se obter maior nível de pureza de α -TCP, pois os reagentes comercializados apresentam grande quantidade de íons magnésio, estabilizador da fase de β -TCP, considerado impureza no material.

O pó de α -TCP foi sintetizado pela mistura desses dois reagentes nas devidas proporções de acordo com a seguinte reação:



Após a mistura manual dos reagentes, o pó foi aquecido a uma taxa de 10°C por minuto até 1300°C e permaneceu nesta temperatura por duas horas, e depois esfriado lentamente até a temperatura ambiente, dentro do forno.

3.2 Moagem do pó de α -TCP

O pó de α -TCP passou por dois processos distintos de moagem:

Processo 01: Moinho de Bolas Horizontal – Amostra MH

O pó foi colocado em um frasco plástico juntamente com bolas de alumina (15mm de diâmetro), em um moinho de bolas horizontal (Figura 3.2), com rotação de 40rpm por 4 horas. Com o movimento de rotação do eixo, houve colisão das bolas de alumina com o pó, quebrando as partículas por atrito.



Figura 2.2 Moinho de Bolas Horizontal

Processo 02: Moinho de Alta Energia – Amostra AE

O pó, após passar pelo processo 01 de moagem, foi colocado em potes de polietileno de alta densidade, juntamente com bolas de zircônia (0,5mm de diâmetro), alojados em cilindros metálicos no moinho de alta energia (Figura 3.3) (desenvolvido pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan – USP São Carlos), com rotação de 40rpm por 4 horas, total de 8 horas. Assim como no processo 1, a colisão entre as bolas e o pó resultou na quebra das partículas por atrito, porém este ocorre por vibração da base em que os cilindros estão fixados.



Figura 3.3 Moinho de Alta Energia.

3.3 Preparação do cimento de α -TCP

Os corpos de prova foram obtidos através da mistura do pós obtidos da moagem de α -TCP com uma fase líquida, segundo a reação abaixo:



Foi utilizada como fase líquida uma solução aquosa com 2,5% de hidrogeno fosfato de sódio (Na_2HPO_4). O Na_2HPO_4 foi escolhido por ser um aditivo que acelera a reação de pega, ou seja, acelera a hidrólise de α -TCP para formação de CDHA (Ginebra et al. 1998) e maior quantidade desta apatita. Além disso, com este aditivo há aumento da resistência mecânica do cimento (Oda et al. 2008).

Para a amostra MH foi utilizado uma relação líquido/pó de 0,37 e para a amostra AE a relação foi de 0,30, que apresentou pequena variância com o valor descrito na literatura de 0,32mL/g (Fernández et al. 2005 e Ginebra et al. 1999). Os valores das relações líquido/pó foram escolhidos de acordo com a consistência do material durante a reação de pega, considerada ideal para a fabricação do cimento.

Com a mistura das duas fases houve formação de uma pasta que endureceu de acordo com a reação de pega. Essa pasta foi moldada em moldes de Teflon para a obtenção dos corpos de prova (6mm de diâmetro e 12mm de altura) (Figura 3.4) para os ensaios de resistência mecânica. Para os ensaios *in vitro*, foram moldadas pastilhas de 7mm de diâmetro. Após 15 minutos, os moldes foram colocados em imersão por um período de 7 dias em solução fisiológica 0,9% NaCl até completa transformação e precipitação em CDHA.

Após os 7 dias, os corpos de prova foram retirados dos moldes e secados em estufa para retirada total da umidade.

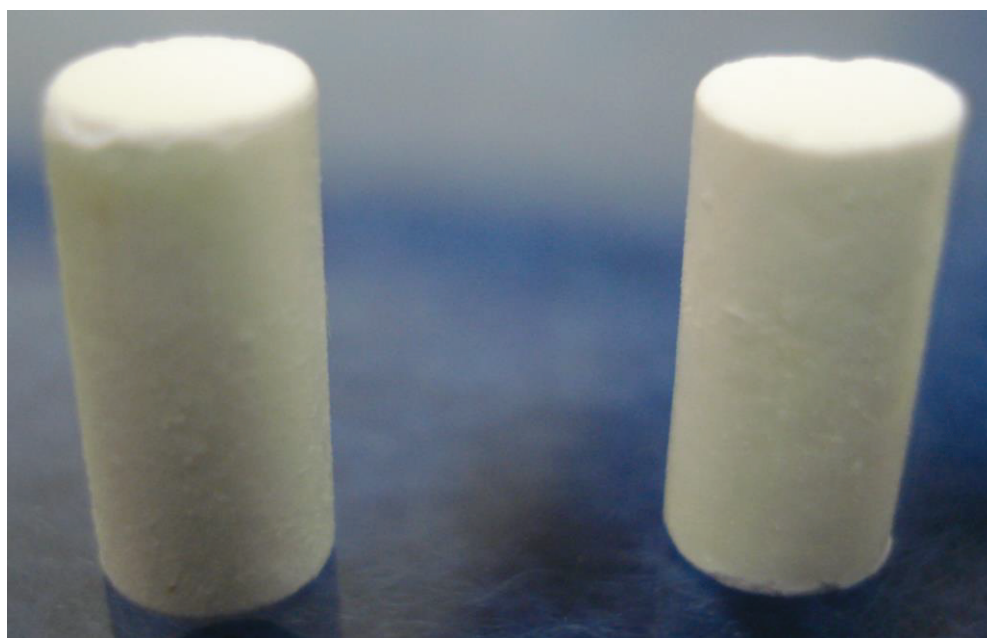


Figura 3.4 Corpos de prova do cimento de α -TCP.

3.4 Caracterizações

Os reagentes, o pó e o cimento de α -TCP foram caracterizados pelas seguintes técnicas:

Difração de Raios-X – análise qualitativa

A pureza de fase dos compostos e possíveis contaminações com fases indesejadas foram determinadas através de análise comparativa entre os difratogramas obtidos dos materiais com os padrões JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) do carbonato de cálcio (05-0586), da monetita (09-0080), do α -TCP (09-0348), do β -TCP (09-0169) e da CDHA (09-0432) – (Rigaku, DMAX 2200, 20mA, 40kV, 0,01°s⁻¹).

Fluorescência de Raios-X – análise semi-quantitativa

A presença de elementos minoritários e majoritários, e outros possíveis elementos tóxicos que possam comprometer a biocompatibilidade do cimento foram determinadas através da fluorescência de raios-X. Para cada amostra foram realizadas três análises. (Shimadzu, modelo XRF 1800, fonte de radiação Rh, 50kV, área de 10mm de diâmetro).

Microscopia Eletrônica de Varredura – análise qualitativa

As características morfológicas do material (análise da superfície, tamanho e homogeneidade) foram determinadas através de micrografias obtidas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol SEM-5900LV), que foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro (Bal-Tec MCS010).

Análise do Tamanho e Área Superficial das Partículas – análise quantitativa

A distribuição granulométrica dos pós após a moagem foi realizada através de análise do tamanho de partícula (MasterSizer 2000), que passaram previamente por ultrassom em álcool isopropílico para dispersão das partículas do pó.

A área superficial específica das partículas das amostras foi determinada pelo método BET através da adsorção física de gases (Micrometrics, Modelo ASAP 2010).

Ensaio de Resistência Mecânica – análise quantitativa

Foram utilizados 8 corpos de prova de cimento de cada uma das amostras, MH e AE, para serem testados quanto ao seu limite de resistência a compressão uniaxial em uma máquina universal de ensaios (Servohidráulico para Ensaios Mecânicos, Modelo 810 – Flex Test 40, MTS). Os valores foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA (Minitab 16) e foi utilizado nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3.5 Ensaios biológicos

Ensaios *in vitro* – análise quantitativa

Foram utilizados 10 pastilhas de cada amostra para as análises *in vitro*. E foi avaliado o Índice de Citotoxicidade 50% (IC50% ou GI50), valor referente à concentração do extrato que mata 50% da população de células viáveis.

Todos os ensaios *in vitro* foi realizado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA - Unicamp) no Departamento de Farmacologia e Toxicologia, sob supervisão do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho.

Todas as amostras foram avaliadas quanto a sua atividade antiproliferativa em células tumorais humanas utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular (Monks et al., 1991).

Foram empregadas 10 linhagens de células tumorais humanas (Tabela 3.1). Estas linhagens foram cedidas gentilmente pelo Frederick Cancer Research & Development Center, National Cancer Institute (NCI, EUA) e foram mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm³ (Nunc®), com 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Foi também empregada uma linhagem de célula normal, a saber, a linhagem HaCat (queratinócito normal humano), doada pelo professor doutor Ricardo Della Coletta, do Departamento de Diagnóstico Oral, área de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp.

Tabela 3.1 Linhagens celulares humanas empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Linhagem	Órgão/Doença	Origem Embrionária	Densidade de Inoculação (10⁴ cel/mL)
U251	SNC; glioma	Ectoderme	4,0
MCF-7	Mama; adecarcinoma	Ectoderme	6,0
NCI-ADR/RES	Ovário; adenocarcinoma	Ectoderme	5,0
786-O	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme	5,0
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme	4,0
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme	4,5
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme	7,0
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme	5,0
K562	Medula óssea; Leucemia mielóide crônica	Mesênquima	6,0
HaCaT	Pele (queratinócito)/Normal	Ectoderme	5,0

Foram inoculados 100µL/poço, em placas de 96 poços (Nunc®), de cada suspensão celular, na densidade de inoculação descrita na Tabela 1, em meio RPMI/5% SFB, acrescido de penicilina:estreptomicina (1000U/mL:1000µg/mL, 1mL/L RPMI). Após 24h de incubação, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, foram adicionados 100µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250µg/mL).

Para preparação das amostras, uma alíquota de 10 mg de cada amostra foi dissolvida em 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50µL dessa solução-mãe foram dispersos em 950µL de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi então diluída sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250µg/mL. A concentração final de DMSO não interfere no crescimento celular.

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico Doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25µg/mL. No momento da adição das amostras, foi realizada a fixação, com ácido tricloroacético (TCA) a 50%, da placa controle chamada T0, o que permitiu determinar a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50µL/compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1h a 4°C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as células foram coradas com 50µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvidas em ácido acético 1% e mantidas por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®), 10µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração de cada amostra, o crescimento celular, expresso em porcentagem, foi calculado segundo as seguintes fórmulas:

Se $T > T1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular

Se $T1 > T \geq T0 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T-T0)/(T1-T0)]$

Se $T < T0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T-T0)/T0]$

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

T1 = absorbância do branco de células.

T0 = absorbância do controle de células na placa T0.

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada, para cada uma das linhagens testadas (software Origin 8.0). Três concentrações efetivas denominadas GI50 (do inglês *growth inhibition*, concentração necessária para interromper em 50% o crescimento celular), TGI (do inglês *total growth inhibition*, concentração

necessária para que ocorra 0% de crescimento celular) e LC50 (do inglês *lethal concentration*, concentração necessária para que ocorra 50% de morte).

Ensaio *in vivo* – análise qualitativa

Foram utilizados 18 ratos adultos machos da linhagem Wistar provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Campinas (Cemib). Os animais foram divididos em 3 grupos (6 animais cada): controle, implantados com cimento MH e implantados com cimento AE. Os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Unicamp) – Processo 2706-1.

Todos os experimentos animais foram realizados no Instituto de Biologia (IB – Unicamp) no Laboratório de Ultraestrutura Celular da Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling, sob supervisão de sua aluna de mestrado Edilene Siqueira Soares.

Os animais receberam anestesia geral através da administração intra-peritoneal de cloridrato de ketamina (85mg/kg) e xilazina (12mg/kg). Após a tricotomia e assepsia da região fronto-parietal, foi realizada uma incisão mediana, de aproximadamente 20mm, na pele ao longo da sutura sagital. A musculatura e o periósteo foram rebatidos para a exposição do osso parietal.

Com o auxílio de uma broca trefina de baixa rotação de 5mm de diâmetro, foi criado um defeito ósseo na calvária de cada um dos ratos, sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9%NaCl. O tamanho do defeito de 5mm, baseado na literatura, foi calculado para evitar o fechamento espontâneo do osso parietal, o que garante a confiança das conclusões acerca da eficiência do reparo da biocerâmica (Silva, 2005).

Os segmentos ósseos foram removidos delicadamente e inseridos os cimentos das amostras MH e AE nos grupos tratados e solução tampão de Na₂HPO₄ (veículo) no grupo controle, sendo que dois animais permaneceram como controle “sham” (sem cirurgia).

Para o experimento animal, as amostras MH e AE foram previamente esterilizadas por tratamento com óxido de etileno, realizado pela empresa Acecil®.

Posteriormente, a musculatura e o periósteo foram reposicionados e a epiderme fixada com sutura de nylon 4.0.

No pós-operatório foi administrado Dipirona sódica (200mg/kg) durante 7 dias.

Todos os animais foram monitorados, com alimentação *ad libitum*, até 90 dias após a cirurgia.

Após este período, os animais foram sacrificados com dose letal de anestésico: cloridrato de ketamina e xilazina na proporção de 2:1, via intraperitoneal. Foi feita toracotomia e os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo com soro fisiológico 0,9%, seguido por paraformaldeído 4% em 0,1M de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 para a fixação dos órgãos. O cérebro, o rim esquerdo e o fígado de todos os animais foram imediatamente removidos e pós-fixados no mesmo fixador overnight.

Os órgãos descritos anteriormente foram escolhidos porque o fígado é o maior órgão interno e maior glândula no corpo e situa-se abaixo do diafragma. Participa do processo digestivo ao produzir a bile para a emulsificação de gorduras. Além disso, tem como função a desintoxicação do organismo, entre outras. Os rins são órgãos responsáveis pela filtração sanguínea e por remover produtos residuais do metabolismo e transportá-los para o exterior. Desse modo, a análise histológica desses órgãos é de grande importância para avaliar se o implante induz reação adversa nestes órgãos.

O cérebro foi retirado para observar se houve alguma injúria durante a cirurgia.

Depois, todos os órgãos foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Paraplast®, Sigma Aldrich). Secções de 5µm de espessura foram cortadas em micrótomo 2035 RM (Reichert S, Leica) e passadas por série de etanol e xilol para desparafinização. Foram utilizadas coloração de: Hematoxilina-Eosina, para diferenciar partes basófilas de acidófilas, em que se pode observar os ácidos nucléicos e proteínas do citoplasma.

Foram tiradas micrografias das lâminas no microscópio óptico (Olympus BX51 fotomicroscópio, Japan), com aumento de 40x, para análise da morfologia tecidual, visualização de células do processo inflamatório (neutrófilos, macrófagos, linfócitos, etc.), da formação e continuidade da cápsula fibrosa (avaliada pelo grau de maturação e organização tecidual), da presença de necrose e de fragmentos de cimento no tecido analisado (Gomes Filho, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Difração de Raios-X

As análises de raios-X dos reagentes, monetita e carbonato de cálcio, apresentaram as fases químicas correspondentes esperadas. Consequentemente, o difratograma de raios-X do pó de α -TCP mostrou, igualmente, a fase cristalina correspondente e alto nível de pureza, assim como as amostras após os processos de moagem (MH e AE), como mostrado na Figura 4.1. Não apresentaram picos da fase de β -TCP ou qualquer outro tipo de contaminação devido aos processos de moagem. Foi possível obter alta pureza da fase de α -TCP em menor temperatura e tempo de sinterização do que consta na literatura (Almirall et al., 2004, Sanchez de Val et al., 2012).

A Figura 4.2 apresenta o difratograma dos cimentos obtidos das amostras MH e AE, observa-se a total precipitação e conversão do pó de α -TCP em hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA).

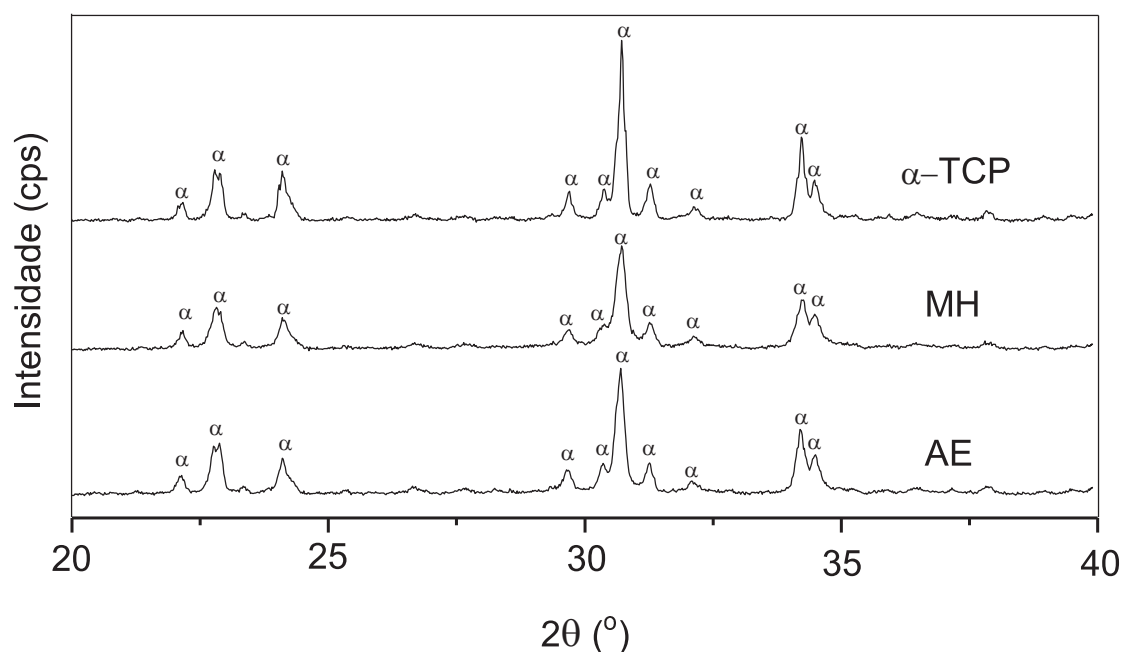


Figura 4.1 Difratograma das amostras. α – Fase alfa-fosfato tricálcico.

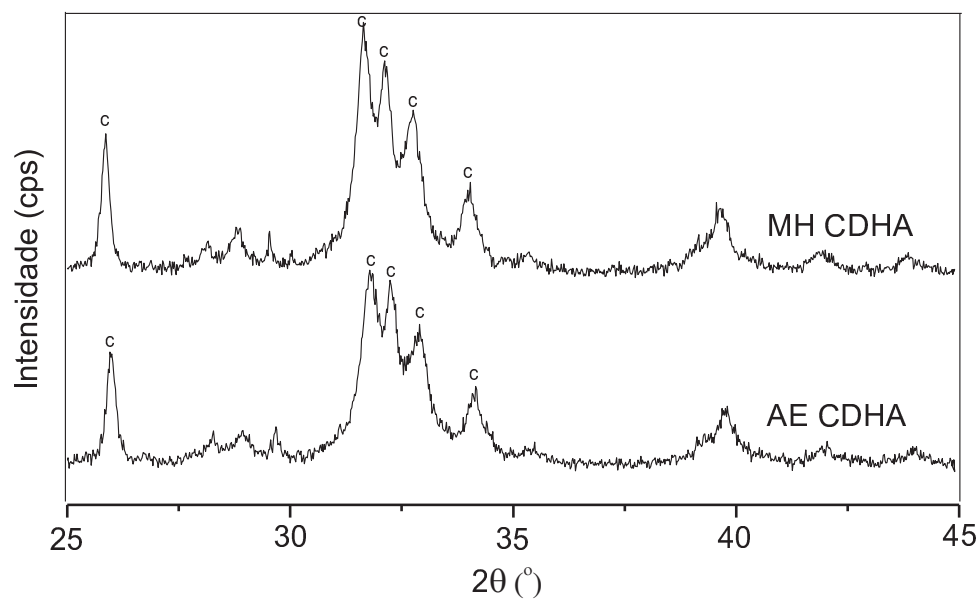


Figura 4.2 Difratoograma dos cimentos das amostras. c - Fase de hidroxiapatita deficiente em cálcio.

4.2 Fluorescência de Raios-X

Os reagentes foram analisados quanto aos seus elementos majoritários e minoritários, principalmente, para verificar a presença de magnésio, estabilizador da fase do β -TCP e não constatou-se contaminação por este elemento.

Além disso, a análise de elementos minoritários (Tabela 4.1) por fluorescência de raios-X do pó de α -TCP e das amostras MH e AE também confirmaram a ausência de contaminação durante o processo de sinterização e de moagem.

Tabela 4.1 Elementos minoritários das amostras (% em peso).

	Na	Si	Sr	Fe	Al	Cr
α-TCP	0,03	0,008	0,01	0,008	-	-
Amostra MH	-	-	0,01	0,02	0,05	0,04
Amostra AE	-	-	0,008	0,02	0,09	0,03

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Figura 4.3, observa-se a morfologia das partículas de α -TCP após a sinterização. Os grãos apresentam contorno irregular, grande tamanho de partícula e alta porosidade, o que pode ser explicada pela evolução do CO_2 durante a reação de obtenção do pó de α -TCP (Santos, 2002a).

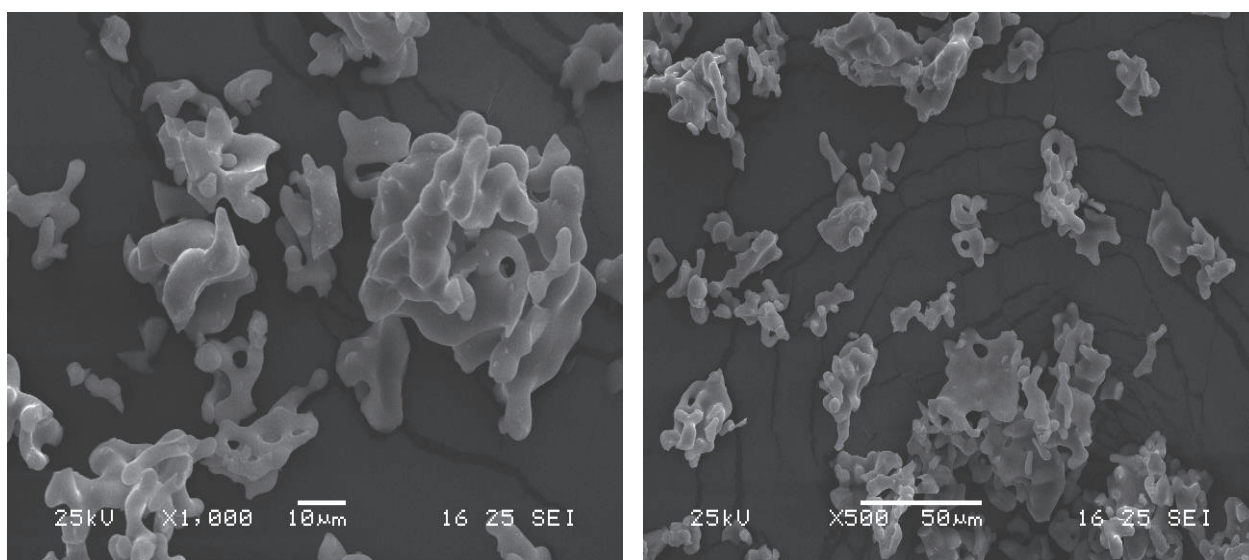


Figura 4.3 Micrografias do pó de α -TCP.

Já na Figura 4.4, após a moagem constatou-se mudança na morfologia dos grãos, bem como a diminuição visível do tamanho da distribuição granulométrica, ou seja, os processos de moagem foram eficientes. Nota-se ainda que na amostra AE, visivelmente, há presença de maior quantidade de partículas menores ao se comparar com a amostra MH. Assim, a amostra MH está relacionada com uma maior distribuição granulométrica que aumenta o volume necessário de líquido durante a reação de pega para a formação do cimento. E portanto, não é possível utilizar a mesma relação líquido/pó que foi escolhida para a amostra AE.

A Figura 4.5 mostra as superfícies de fratura dos cimentos após o ensaio de resistência mecânica a compressão, obtidos das amostras MH e AE, em ambos houve precipitação em

hidroxiapatita deficiente em cálcio na forma de agulhas e placas, que são características do cimento de fosfato de cálcio baseados no sistema do α -TCP (Santos, 2002a). As micrografias do cimento da amostra MH apresentam maior quantidade de poros que pode estar relacionado com sua maior relação líquido/pó que influencia em sua porosidade e, conseqüentemente, na sua resistência mecânica.

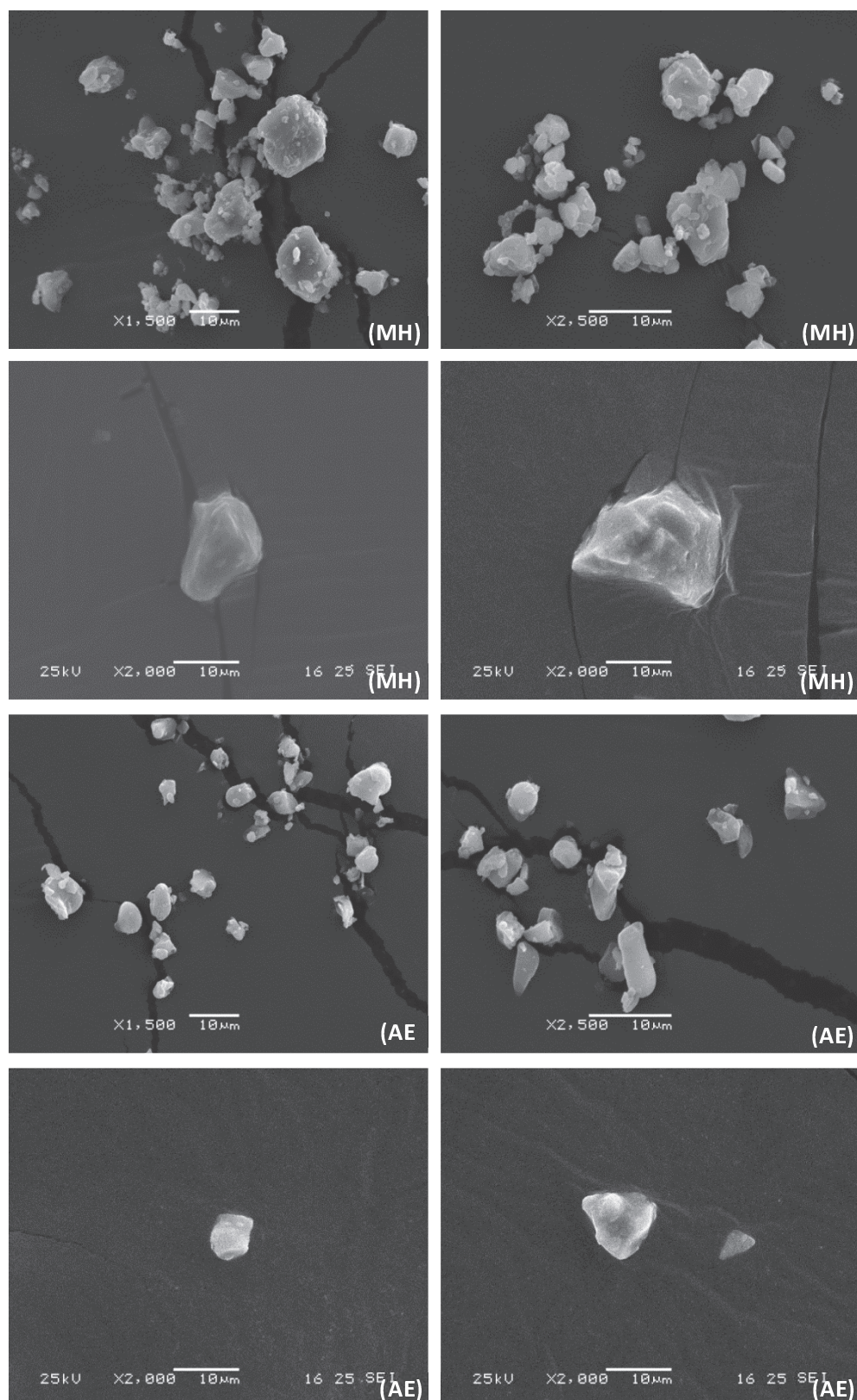


Figura 4.4 Micrografias das amostras MH e AE.

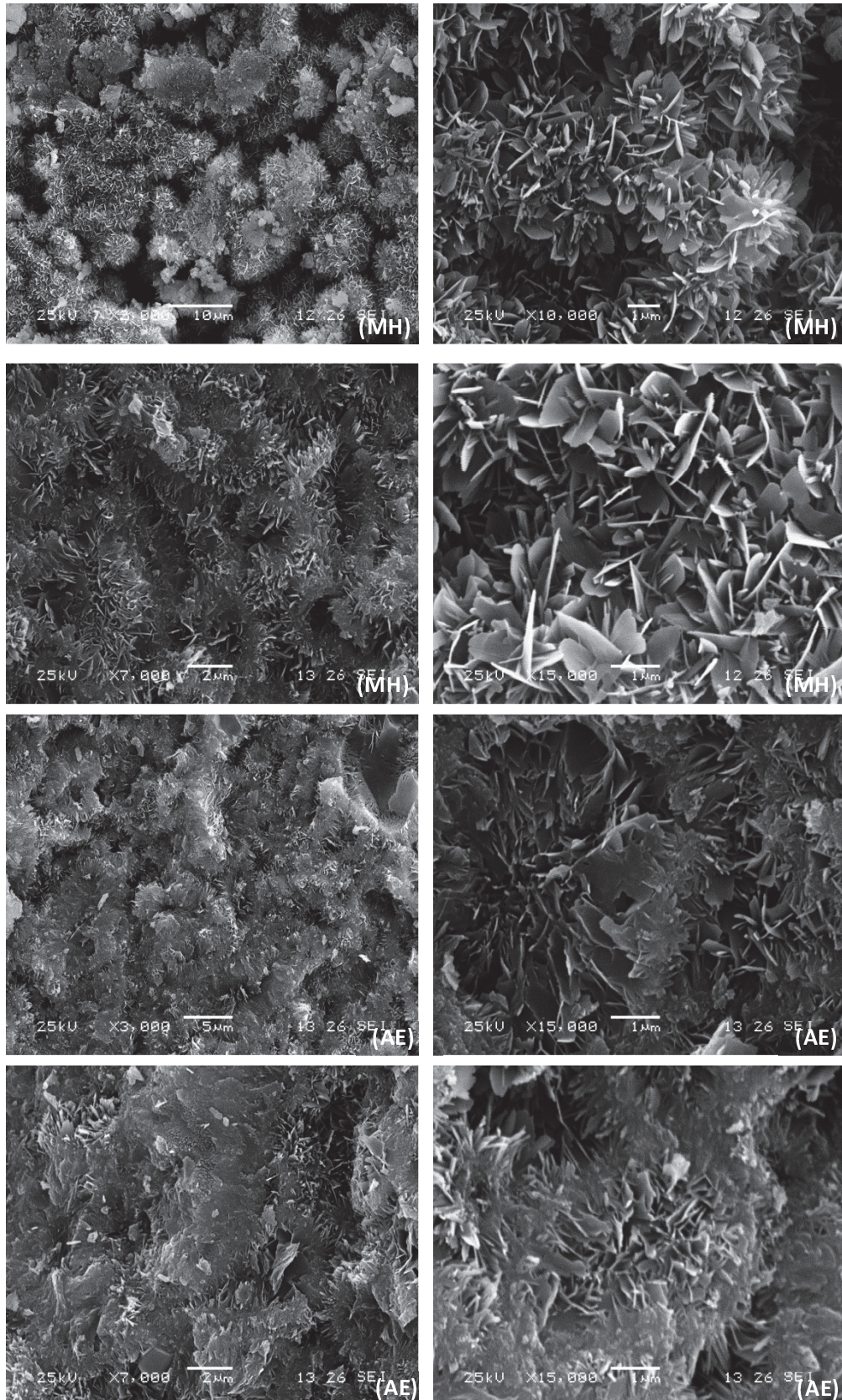


Figura 4.5 Micrografias dos cimentos obtidos das amostras MH e AE.

4.4 Distribuição Granulométrica

As distribuições granulométricas apresentadas nas Figuras 4.6 e 4.7 e quantificadas na Tabela 4.2 das amostras MH e AE mostram que estas possuem tamanhos de partículas estatisticamente iguais.

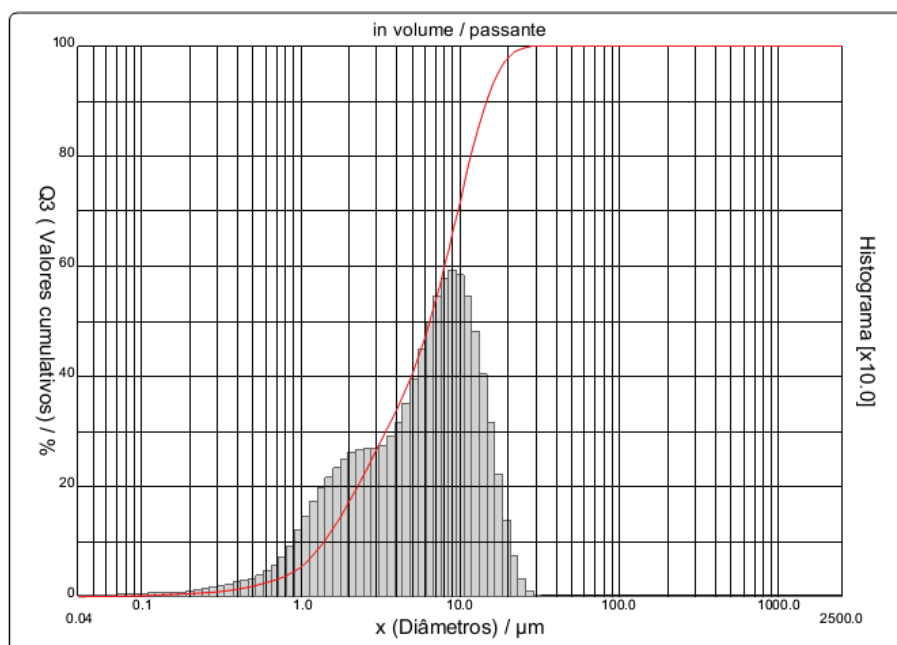


Figura 4.6 Distribuição granulométrica da amostra MH.

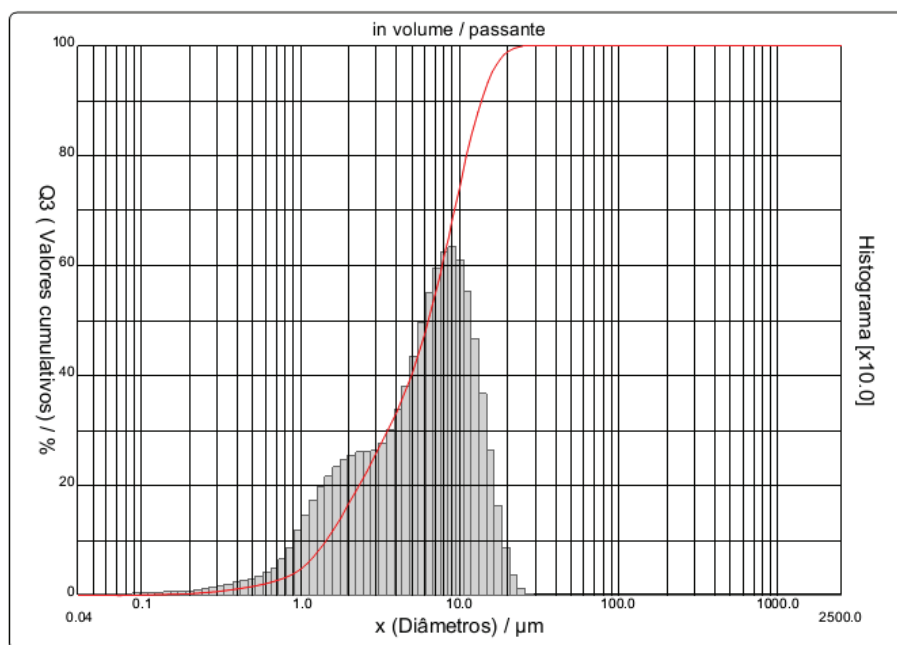


Figura 4.7 Distribuição granulométrica da amostra AE.

Tabela 4.2 Parâmetros de tamanho de partícula das amostras MH e AE.

	D(10) μm	D(50) μm	D(90) μm	Tamanho médio (μm)
Amostra MH	1,40	6,48	14,66	7,32
Amostra AE	1,44	6,37	13,68	7,03

Contudo, pela análise da área superficial (Tabela 4.3) é possível constatar que o valor da amostra AE, que possui menor área superficial específica pode estar relacionado com uma menor distribuição granulométrica.

Tabela 4.3 Valores da área superficial (m^2/g)

	Área superficial BET
Amostra MH	$1,326 \pm 0,047$
Amostra AE	$0,633 \pm 0,034$

Assim, ao considerar os resultados dado pelas micrografias da Microscopia Eletrônica de Varredura, dos limites de resistência mecânica a compressão e da diferença na relação líquido/pó

utilizada na fabricação dos cimentos, em conjunto com a diferença observada na Tabela 4.3, provavelmente as duas amostras possuem distribuição granulométrica distintas.

Provavelmente, não houve a dispersão das partículas do pó da amostra AE ao realizar a análise de distribuição granulométrica. Com os grãos aglomerados, o valor medido do tamanho não foi somente de uma única partícula.

4.5 Ensaio de Resistência Mecânica

Outro resultado que demonstra a diferença entre as amostras MH e AE são os valores dos limites de resistência a compressão axial, a Tabela 4.4 apresenta as médias e o desvio padrão dos valores obtidos.

A Figura 4.8 mostra os limites de resistência mecânica a compressão axial dos corpos de prova de cada amostra e sua análise estatística comprova que as duas amostras possuem diferença significativa quanto à sua resistência mecânica ($p < 0,05$). Provavelmente, esta diferença está relacionada com a relação líquido/pó utilizada para se obter os cimentos de cada amostra. Como na amostra MH foi utilizada maior volume líquido para a obtenção do cimento, provavelmente, o material possuía uma distribuição granulométrica maior. Zhang et al. (2011) mostrou que quando a relação líquido/pó aumenta, a porosidade também aumenta.

Observa-se que o desvio padrão da amostra AE foi consideravelmente maior que a amostra MH, isso provavelmente deve-se às diferenças da forma como foi misturado e manipulado. Lima et al. (2008) mostrou que a resistência do material é dependente não apenas de sua composição química, mas de sua manipulação, da forma de aplicação, da temperatura local e da presença de outras substâncias a ele incluídas. Em relação a esta propriedade, a maneira de preparação dos corpos de prova é um dos fatores mais significativos para ocorrer variação no limite de resistência mecânica (Damien e McDermott, 1998).

Com os valores obtidos, é possível utilizar tais materiais para substituição em ossos trabeculares, que possuem limite de resistência a compressão menores (cerca de 2 a 12 MPa, Hench e Wilson 1996) do que das amostras MH e AE, porém não é indicado para substituição em

ossos corticais. Assim, o cimento baseado no sistema de α -TCP pode ser recomendável para implantes da região bucomaxilofacial.

Tabela 4.4 Valores da média e desvio-padrão dos limites de resistência.

Amostras	Média (MPa)
MH	52,94 $\pm$ 5,07
AE	70,32 $\pm$ 14,91

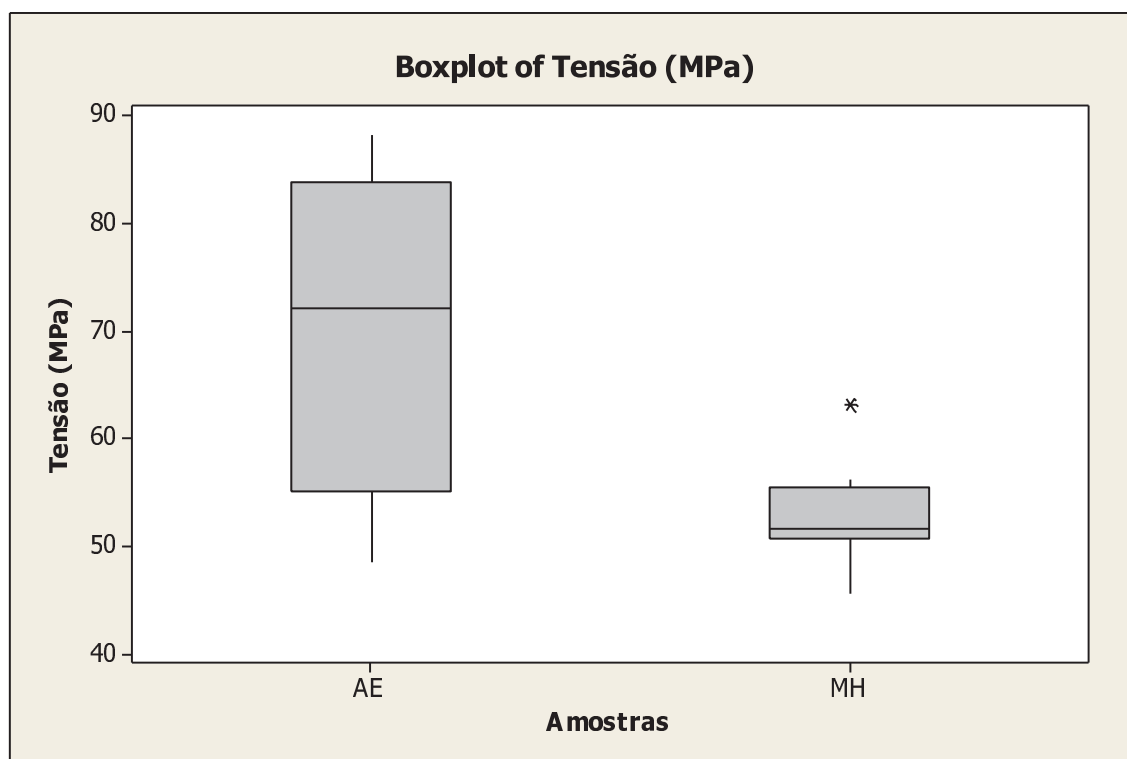


Figura 4.8 Boxplot do limite de resistência à compressão axial.

4.6 Teste de Citotoxicidade

No teste de citotoxicidade, o controle positivo, quimioterápico Doxorrubicina, apresentou efeito antiproliferativo, como esperado (Figura 4.9).

Os resultados dos testes de citotoxicidade das amostras MH e AE estão apresentados nas Figuras 4.10 e 4.11, respectivamente, e mostram que nenhuma das amostras causou a redução do crescimento celular em 50%. E obteve valores de IC50% maiores que 250µg/mL, que foi a maior concentração avaliada no experimento. Esses valores indicam que o material não é citotóxico e é recomendável para utilização.

Porém, é possível observar que o material diminui a viabilidade celular, porém isso ocorre, provavelmente, devido a liberação de íons da dissolução do cimento de α -TCP durante o tempo do ensaio, que modifica o pH do meio celular. Estudo (Gustavsson et al. 2011) mostra que o CDHA exposto a meio de cultura celular está sujeito a um equilíbrio em que ocorre liberação e absorção de íons que está relacionado a dois parâmetros: a composição química do meio aquoso e o tempo de exposição. Assim, a reatividade iônica do biomaterial e a resposta celular ao ensaio *in vitro* devem estar relacionadas a estes parâmetros.

Desse modo, um perfil detalhado do equilíbrio iônico que ocorre durante o ensaio *in vitro*, medição direta do pH e maior tempo de duração do ensaio podem dar resultados mais esclarecedores sobre a resposta celular em relação ao material.

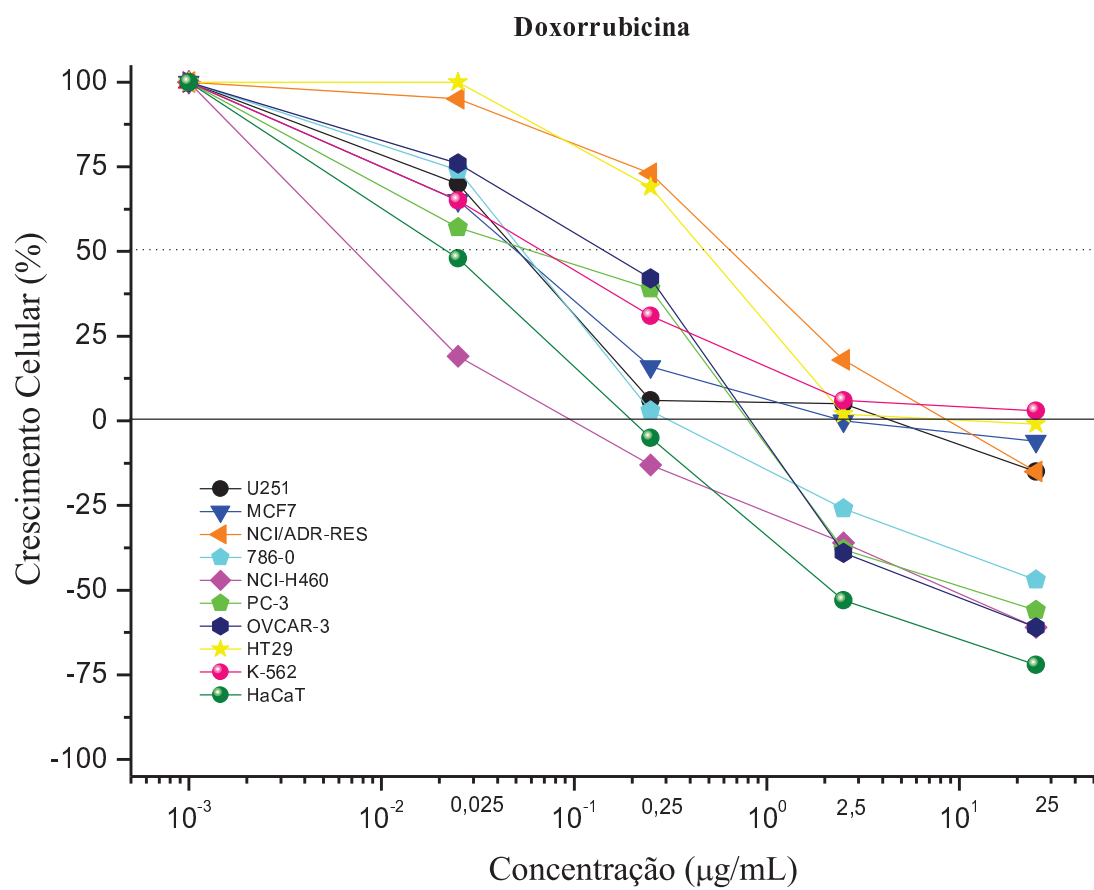


Figura 4.9 Resultados de Citotoxicidade do Controle Positivo.

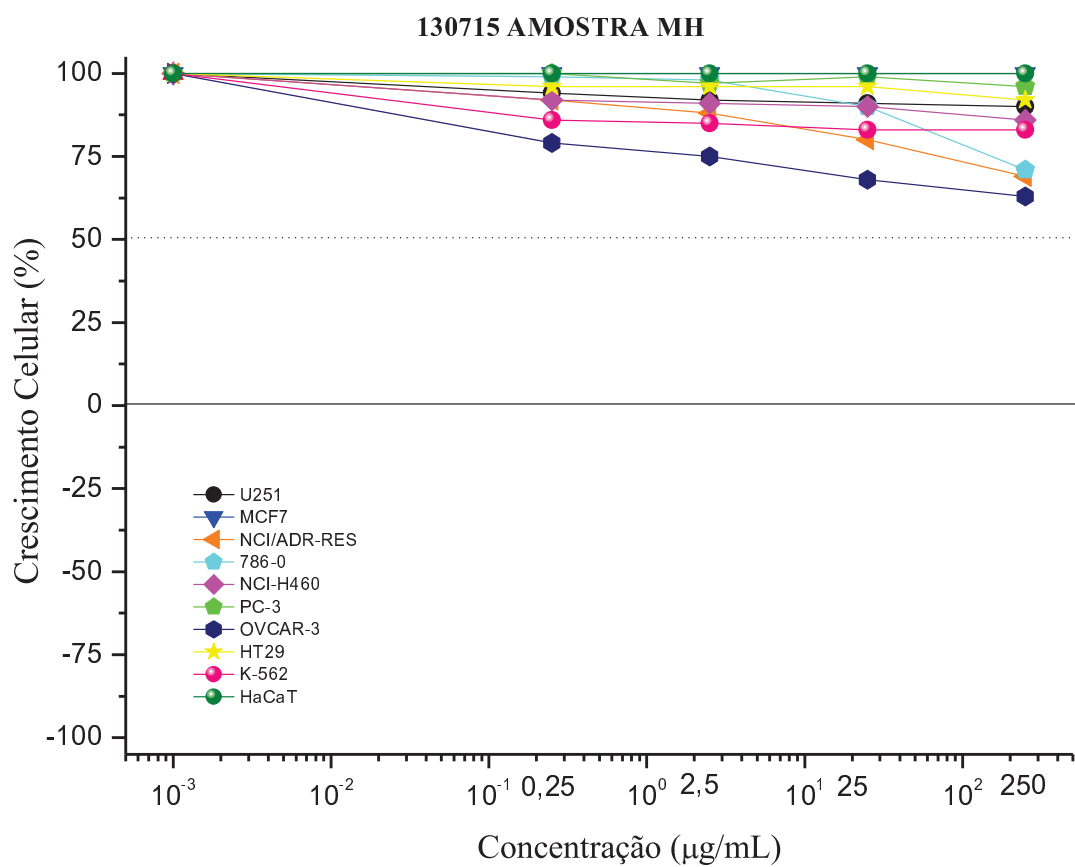


Figura 4.10 Resultados de Citotoxicidade da amostra MH.

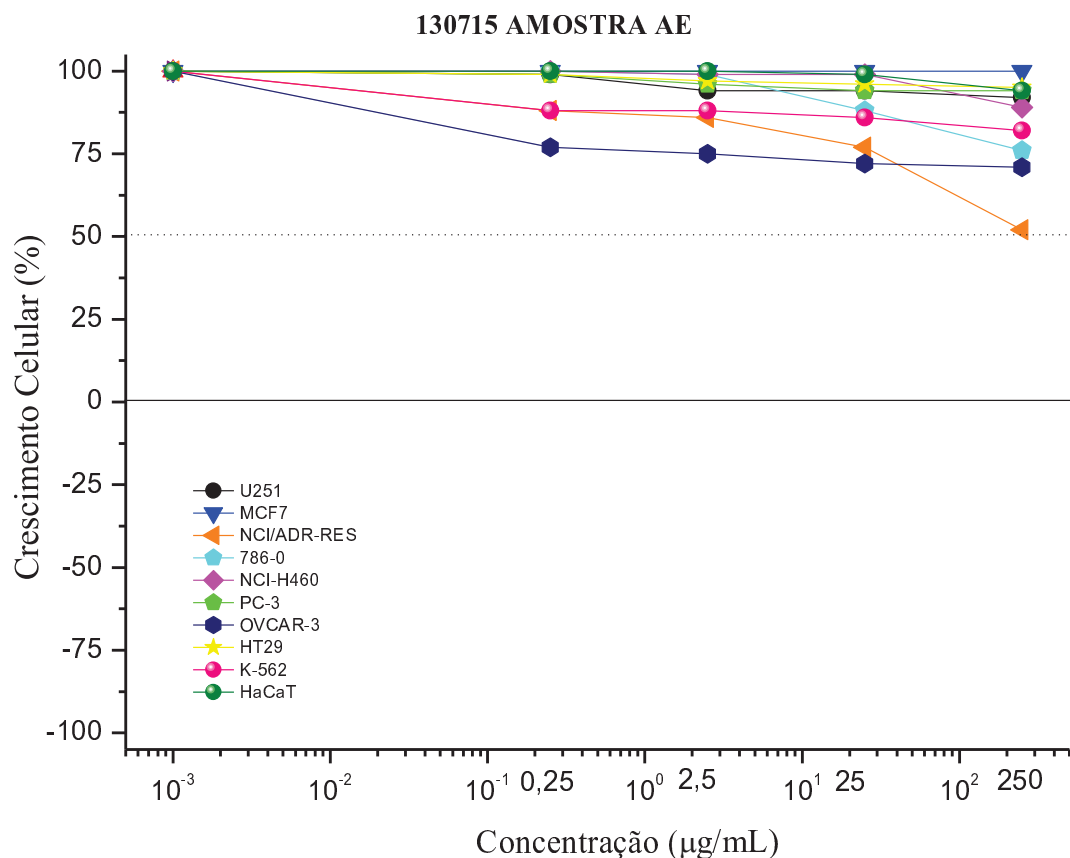


Figura 4.11 Resultados de Citotoxicidade da amostra AE.

4.7 Histologia

Em todos os experimentos realizados, os rins apresentaram morfologia tecidual e celular normais, como mostra a Figura 4.12. Os órgãos apresentam organização unilobar, característica de ratos. Os corpúsculos renais se apresentaram íntegros, formado pelos glomérulos e a cápsula de Bowman. Os néfrons, unidades de filtração e que consistem em corpúsculo renal e túbulo renal longo, não apresentaram produtos da biodegradação do biomaterial. Além disso, na região cortical é possível observar os túbulos contorcidos proximais com orla em escova e os túbulos contorcidos distais sem orla em escova. Na região medular, observa-se os túbulos coletores com epitélio cúbico, porções delgadas da alça de Henle e capilares sanguíneos (Junqueira e Carneiro,

2004).

Os fígados, igualmente, apresentaram morfologia tecidual e celular característicos, compatível com a normalidade, como mostra a Figura 4.13. Os hepatócitos, células funcionais do lóbulo hepático, se apresentam em placas espessas que limitam os espaços sinusoidais e não foi observado presença de produtos do metabolismo devido à degradação do biomaterial.

Os cérebros (Figura 4.14) não sofreram danos ou injúrias devido às cirurgias de implante. Os órgãos se apresentaram íntegros com presença de células da glia e neurônios com morfologia celulares normais.

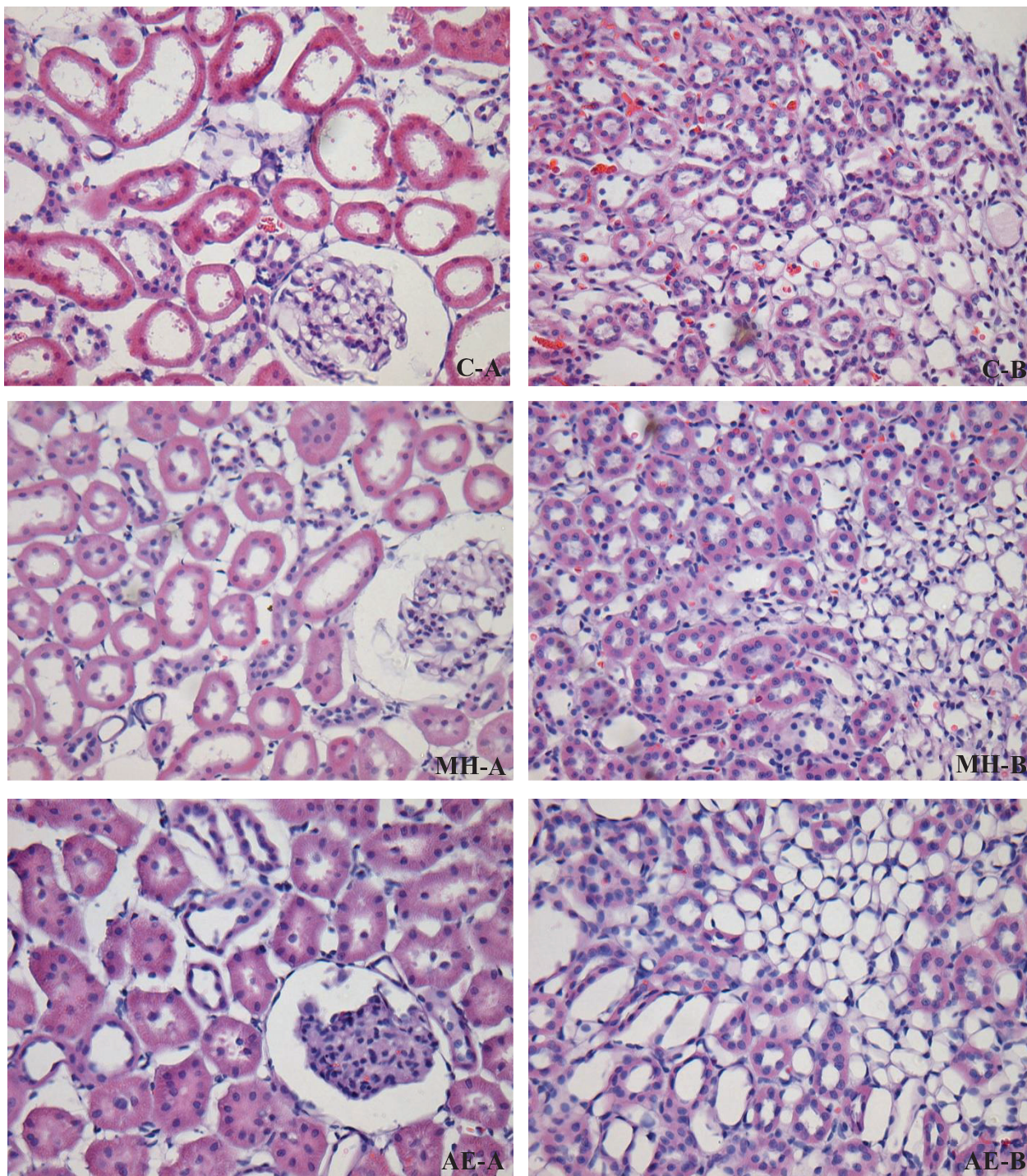


Figura 4.12 Histologia dos rins dos animais controle (C), com implante de cimento MH (MH), com implante de cimento AE (AE). A – região do córtex renal, B – região da medula renal. Aumento de 40x. Coloração Hematoxilina-Eosina.

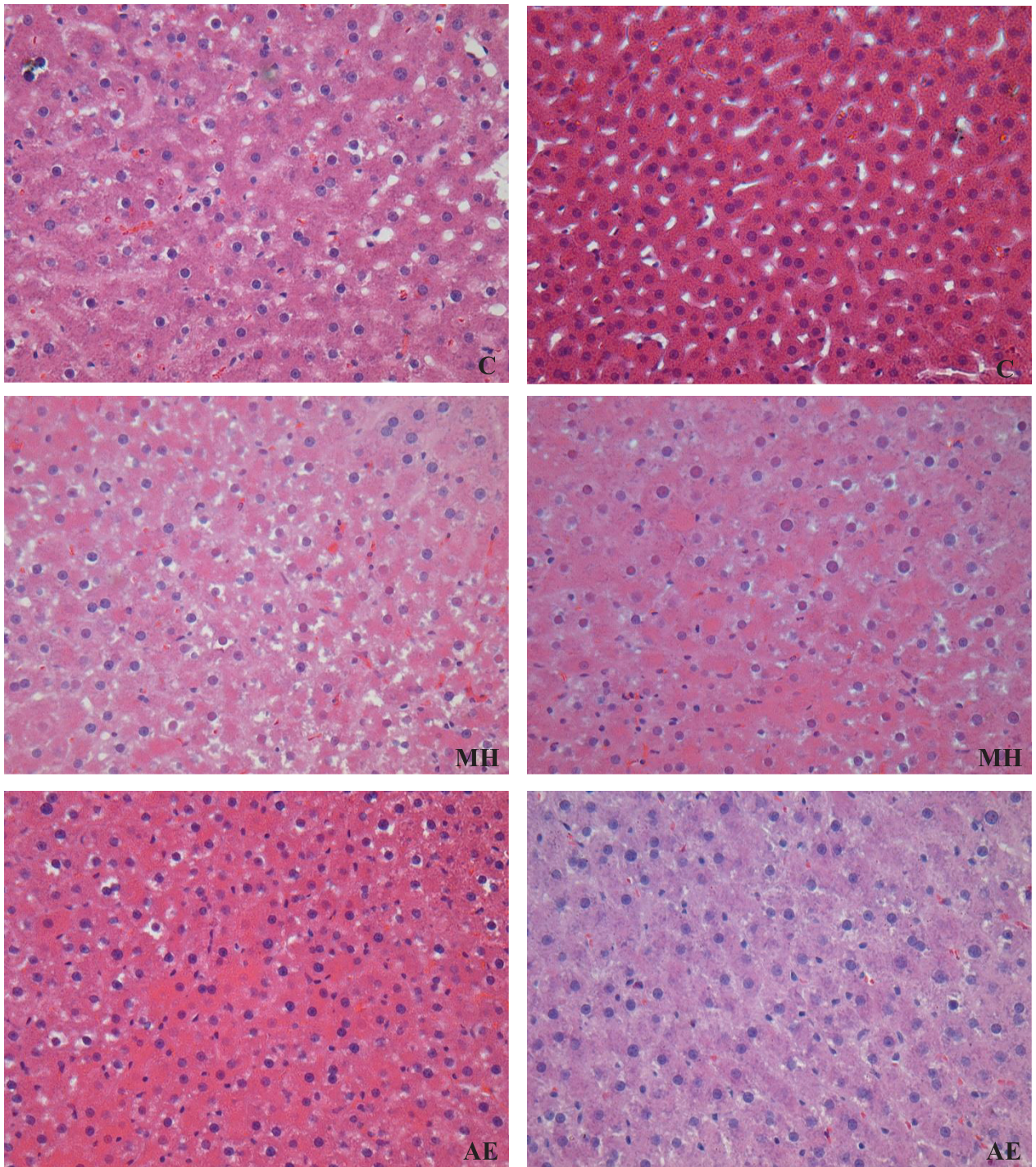


Figura 4.13 Histologia do fígado dos animais controle (C), com implante de cimento MH (MH) e com implante de cimento AE (AE). Aumento de 40x. Coloração Hematoxilina-Eosina.

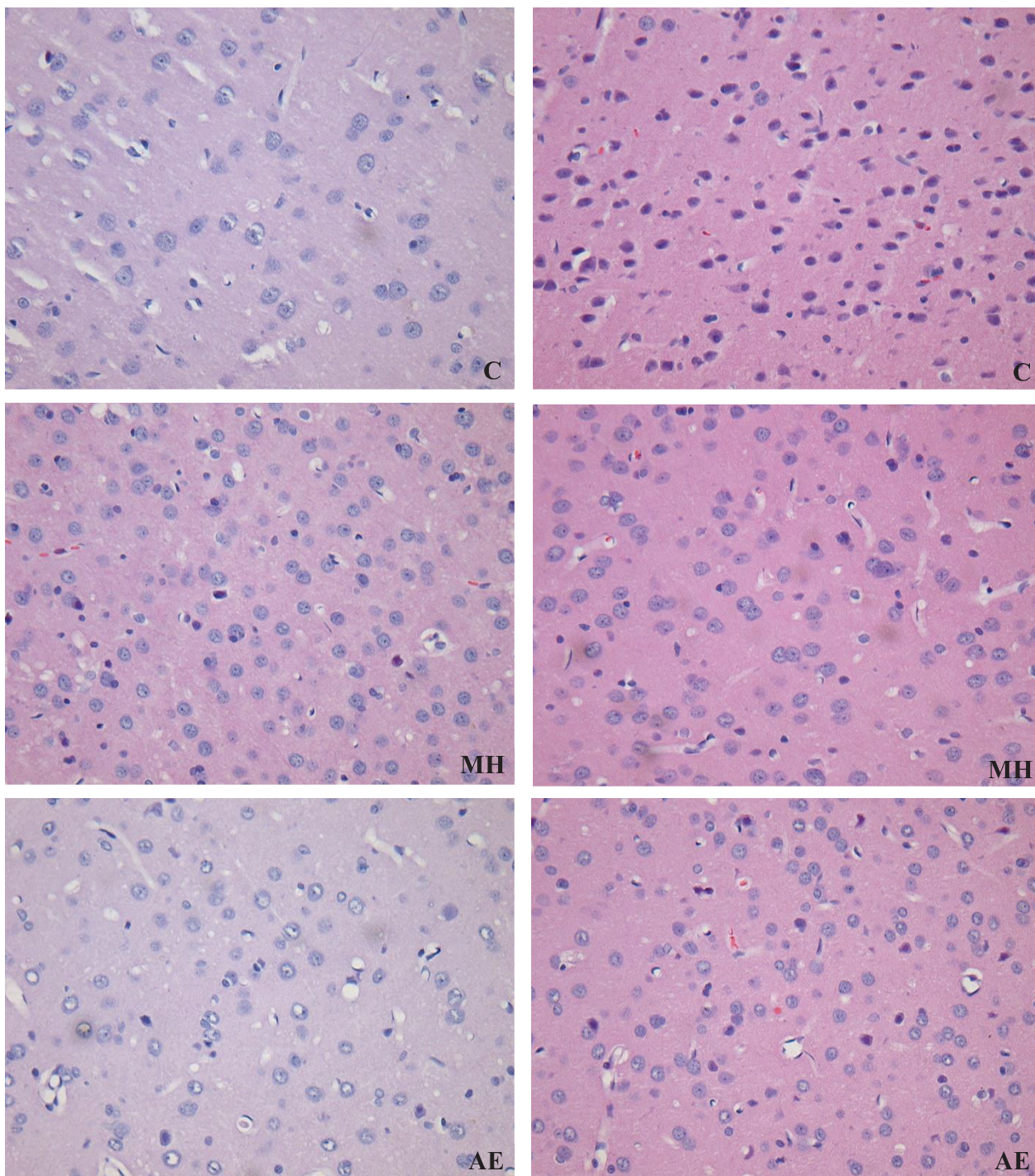


Figura 4.14 Histologia do cérebro dos animais controle (C), com implante de cimento MH (MH) e com implante de cimento AE (AE). Aumento de 40x. Coloração Hematoxilina-Eosina.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1 Conclusões

Obtivemos pó de α -TCP de alta pureza e os processos de moagem foram eficientes, pois houve diminuição do tamanho de partícula e não houve contaminação.

Os ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o material não é citotóxico.

Concluimos que o método de obtenção do cimento de α -TCP a partir da moagem em moinho de bolas horizontal desse pó precursor pode ser a melhor opção ao considerar menor custo e maior facilidade de obtenção. Mesmo com menor valor de limite de resistência mecânica, este ainda é maior se comparado com ossos trabeculares.

5.2 Sugestões para próximos trabalhos

Algumas sugestões para próximos trabalhos seriam:

- O desenvolvimento de técnica ou equipamento que possibilitasse análise do tamanho de partícula de amostras com grãos em escala nanométrica.
- Ensaios *in vitro* com maior tempo de duração e avaliação dos valores de pH e da presença de compostos iônicos ao longo do tempo de ensaio.
- Elaboração e padronização de protocolo referente à descalcificação do tecido ósseo.
- Ensaios *in vivo* com maior tempo de duração para avaliar total degradação do biomaterial e a extensão da ossificação secundária.
- Elaboração e padronização de metodologia de fabricação de cimentos com intuito de diminuir ao máximo a diferença de valores referentes à resistência mecânica.

Referências

- Al-Munajjed, A. A., O'Brien, F. J., 2009. Influence of a novel calcium-phosphate coating on the mechanical properties of highly porous collagen scaffolds for bone repair. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2: 138-146.
- Almirall, A., Larrecq, G., Delgado, J. A., Martinez, S., Planell, J. A., Ginebra, M. P. 2004. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials*. 25: 3671-3680.
- Atkins, P., Jones, L. 2012. Princípios de Química – Questionando a vida moderna e o meio ambiente. *Editora Bookman*.
- Barradas, A. M. C., Yuan, H., Blitterswijk, C. A., Habibovic, P. 2011. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *European Cells and Materials*. 21: 407-429.
- Barradas, A. M. C., Yuan, H., Stok, J., Quang, B. L., Fernandes, H., Chaterjea, A., Hogenes, M. C. H., Shultz, K., Donahue, L. R., Blitterswijk, C., Boer, J. 2012. The influence of genetic factors on the osteoinductive potential of calcium phosphate ceramics in mice. *Biomaterials*. 33: 5696-5705.
- Bignon, A., Chouteau, J., Chevalier, J., Fantozzi, G., Carret, J. P., Chavassieux, P., Boivin, G., Melin, M., Hartmann, D. 2003. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 14: 1089-1097.
- Boeckel, D.G., Shinkai, R.S.A., Grossi, M.L., Teixeira, E.R. 2012. Cell Culture-Based Tissue Engineering as an Alternative to Bone Grafts in Implant Dentistry: A Literature Review. *Journal of Oral Implantology*. 38: 538-545.
- Böhner, M., Galea, L., Doeblin, N. 2012. Calcium Phosphate Bone Grafts Substitutes: Failures and Hopes. *Journal of the European Ceramic Society*. 32: 2663-2671.

Bran, G. M., Stern-Straeter, J., Hörmann, K., Riedel, F., Goessler, U. R. 2008. Apoptosis in Bone for Tissue Engineering. *Archives of Medical Research*. 39: 467-482.

Brenner, M.J., Hilger, P.A. 2009. Grafting in Rhinoplasty. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 17: 91-113.

Callister, W. D., 1991. Materials Science and Engineering: An Introduction. *John Wiley & Sons*.

Camiré, C. L., Gbureck, U., Hirsiger, W., Bohner, M. 2005. Correlating crystallinity and reactivity in an α -tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 26: 2787-2794.

Camiré, C. L., Nevsten, P., Lidgren, L., McCarthy, I., 2006. The effect of crystallinity on strength development of α -TCP bone substitutes. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*. 159-165.

Cardoso, H. A. I. 2010. Cimento de alfa-TCP com diferentes aditivos: cinética da reação de cura, propriedades mecânicas e avaliação da citotoxicidade. *Tese de mestrado*. Campinas: FEM, UNICAMP.

Carrodegua, R. G., De Aza, S., 2011. α -tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 7: 3536-3546.

Chevalier, J; Gremillard, L., 2009. Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. *Journal of the European Ceramic Society*. 29: 1245-1255.

Choi, D., Kumta, P. N., 2007. Mechano-chemical synthesis and characterization of nanostructured β -TCP powder. *Materials Science and Engineering C*. 27: 377-381.

Cortet, B., Marchandise, X. 2001. Bone microarchitecture and mechanical resistance. *Joint Bone Spine*. 68: 297-305.

Damien, H. W., McDermott, K. 1998. Regulatory perspective on characterization and testing of orthopedic bone cements. *Biomaterials*. 19: 1607-1618.

Dorozhkin, S.V., Epple, M. 2002. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed*. 41: 3130–3146.

Eisenbrand, G., Pool-Zbel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J. C., Pieters, R., Kleiner, J. 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*. 40: 193-236.

Fernández, E., Vlad, M. D., Gel, M. M., López, J., Torres, R., Cauich, J. V., Bohner, M. 2005. Modulation of porosity in apatitic cements by the use of α -tricalcium phosphate – calcium sulphate dehydrate mixtures. *Biomaterials*. 26: 3395-3404.

Gomes Filho, J. E. 2001. Avaliação histológica da reação do tecido subcutâneo de ratos após a implantação de cimentos endodônticos. *Tese de doutorado*. Piracicaba: FOP, UNICAMP.

Ginebra, M. P., Driessens, F. C. M., Planell, J. A., 2004. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinect analysis. *Biomaterials*. 25: 3453-3462.

Ginebra, M. P., Fernández, E., Driessens, F. C. M., Planell, J. A. 1998. The effect of Na_2HPO_4 addition on the setting reaction kinetics of an α -TCP cement. In: RZ LeGeros, ed, *Bioceramics*. pp243-6, World Scientific Publishing, New York.

Ginebra, M. P., Fernández, E., Driessens, F. C. M., Planell, J. A. 1999. Modeling of the Hydrolysis of α -Tricalcium Phosphate. *Journal of the American Ceramic Society*. 82: 2808-2812.

Gustavsson, J., Ginebra, M. P., Engel, E., Planell, J. 2011. Ion reactivity of calcium-deficient hydroxyapatite in standard cell culture media. *Acta Biomaterialia*. 7: 4242-4252.

Habibovic, P., Yuan, H., Valk, C. M., Meijer, G., Blitterswijk, C. A., Groot, K. 2005. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 26: 3565-3575.

Hall, S. Biomecânica básica. pp320, *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro.

Hench, L. L., Wilson, J. 1993. Introduction to Bioceramics. pp15. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

Heppenstall, R. B. 1980. Fracture Healing. In: RB Heppenstall, ed, *Fracture Treatment and Healing*. pp35, WB Sanders, Philadelphia.

Jiang, Y., Zhao, J., Rosen, C., Geusens, P., Genant, H. K. 1999. Perspectives on Bone Mechanical Properties and Adaptive Response to Mechanical Challenge. *Journal of Clinical Densitometry*. 2: 423-433.

Junqueira, L. C., Carneiro, J. 2004. Histologia Básica. *Guanabara Koogan*, pp136.

Kierszenbaum, A. L. 2002. Histologia e Biologia Celular – Uma Introdução à Patologia. *Elsevier*, pp128.

Kim, M. S., Kim, Y. J. 2012. Synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in the presence of amphiphilic triblock copolymer. *Materials Letters*. 66: 33-35.

Kurien, T., Pearson, R. G., Scammell, B. E. 2013. Bone grafts substitutes currently available in orthopaedic practice. *Bone Joint Journal*. 95: 583-597.

Lewandrowski, K., Gresser, J.D., Wise, D.L., Trantolo, D.J. 2000. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propyleneglycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. *Biomaterials*. 21: 757-764.

Lima, A. F. M., Rahal, S. C., Muller, S. S., Correa, M. C. E., Padovani, C. R. 2008. Propriedades mecânicas do cimento ósseo e da poliuretana de mamona com e sem catalisador. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 60: 1061-1068.

Liu, H., Yazici, H., Ergun, C., Webster, T. J., Bermek, H., 2008. An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*. 4: 1472-1479.

Manzano, M., Vallet-Regí, M. 2012. Revisiting bioceramics: Bone regenerative and local drug delivery systems. *Progress in Solid State Chemistry*. 40: 17-30.

McNamara, L. 2011. Comprehensive Biomaterials. *Elsevier*, pp170.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd M. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 83: 757-766.

Motisuke, M., Carrodéguas, R. G., Zavaglia, C. A. C. 2008. Mg-Free Precursors for the Synthesis of Pure Phase Si-Doped α -Ca₃(PO₄)₂. *Key Engineering Materials*. Vols. 361-363: 199-202.

Nascimento, C., Issa, J. P. M., Oliveira, R. R., Iyomasa, M. M., Siéssere, S., Regalo, S. C. H. 2007. Biomaterials applied to the bone healing process. *Int. J. Morphol.* 25: 839-846.

O'Brien, F. J. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 14: 88-95.

Perry, C. C. 2003. Biomaterials, synthetic synthesis, fabrication and applications. *Encyclopedia of Physical Science and Technology* (Third Edition).

Oda, M., Takeuchi, A., Lin, X., Matsuya, S., Ishikawa, K. 2008. Effects of liquid phase on basic properties of α -tricalcium phosphate-based apatite cement. *Dental Materials Journal*. 27: 672-677.

Rotter, N., Haisch, A., Bücheler, M. 2005. Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 262: 539-545.

Saijo, H., Igawa, K., Kanno, Y., Mori, Y., Kondo, K., Shimizu, K., Suzuki, S., Chikazu, D., Iino, M., Anzai, M., Sasaki, N., Chung, U., Takato, T., 2009. Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by inkjet printing technology. *J Artif Organs*. 12: 200-205.

Sanchez de Val, J. E. M., Guirado, J. L. C., Ruiz, R. A. D., Fernandez, M. P. R., Martinez, I. M., Marin, J. M. G., Negri, B., Garcia, F. C., Gonzalez, J. M. M., Aza, P. N. 2012. New block graft of α -TCP with silicon in critical size defects in rabbits: Chemical characterization, histological, histomorphometric and micro-CT study. *Ceramics International*. 38: 1563-1570.

Santos, L. A., Carrodéguas, R. G., Rogero, S. O., Higa, O. Z., Boschi, A. O., Arruda, A. C. F. 2002a. α -Tricalcium phosphate cement: "in vitro" cytotoxicity. *Biomaterials*. 23: 2035-2042.

Santos, L. A., 2002b. Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica. *Tese de Doutorado*. Campinas: FEM, UNICAMP.

Silva, R. V., Camilli, J. A., Bertran, C. A., Moreira, N. H. 2005. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 34: 178-184.

Soares, G. A., 2005. Biomateriais. *Fórum de Biotecnologia Biomateriais*. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Suzuki, T., Yamamoto, T., Toriyama, M., Nishizawa, K., Yokogawa, Y., Mucalo, M. R., Kawamoto, Y., Nagata, F., Kameyama, T. 1997. Surface instability of calcium phosphate ceramics in tissue culture medium and the effect on adhesion and growth of anchorage-dependent animal cells. *Journal of Biomedical Materials Research*. 34: 507-517.

Tampieri, A., Celotti, G., Landi, E. 2005. From biomimetic apatites to biologically inspired composites. *Anal Bioanal Chem*. 381: 568-576.

Urban, R. M., Turner, T. M., Hall, D. J., Infanger, S. I., Cheema, N., Lim, T. H., Moseley, J., Carroll, M., Roark, M., 2004. Effects of altered crystalline structure and increased initial compressive strength of calcium sulfate bone graft substitute pellets on new bone formation. *Orthopedics*. 27: 113-118.

Vallet-Regí, M. 2010. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *C. R. Chimie*. 13: 174-185.

Willians, D. F., 1987. Progress in Medical Engineering. *Definitions in Biomaterials*. Vol. 4.

Wong, J. Y., Bronzino, J. D., 2007. Biomaterials. *CRC Press Taylor*.

Yamada, K., Umeda, M., Komori, T., Kawai, T., 2001. Influence of hydroxyapatite (HA) chemical composition on solubility behavior and bone formation. *Jpn Stomatol Soc*. 5090-5097.

Yamada, M., Shiota, M., Yamashita, Y., Kasugai, S., 2006. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of α - and β -tricalcium phosphate in block grafts. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 82: 139-148.

Zhang, J. T., Tancr t, F., Bouler, J. M. 2011. Fabrication and mechanical properties of calcium phosphate cements (CPC) for bone substitution. *Materials Science and Engineering C*. 31: 740-747.

ANEXO A – Certificado expedido pelo CEUA



CEUA/Unicamp

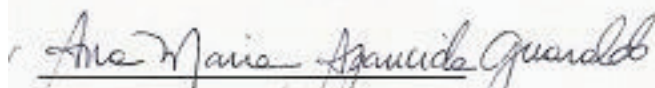
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

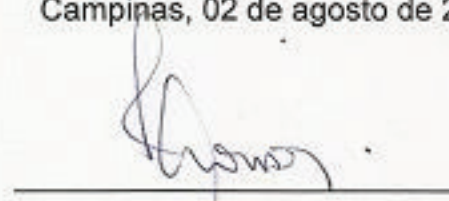
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo da Biocompatibilidade *in-vitro* e *in-vivo* de Cimento de [Alfa]-Fosfato Tricálcico: Diferentes Tempos e Processos de Moagem do Pó" (protocolo nº 2706-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Cecilia Amélia de Carvalho Zavaglia / Lia Saito, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 02 de agosto de 2013.

Campinas, 02 de agosto de 2013.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva