

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS LONDRINA

LUCAS AUGUSTO DE FREITAS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE
HIDROXIAPATITA POROSA COM PROPRIEDADES
OSTEOATIVAS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA
2020

LUCAS AUGUSTO DE FREITAS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE
HIDROXIAPATITA POROSA COM PROPRIEDADES
OSTEOATIVAS.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciência e
Engenharia dos Materiais da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná – Campus
Londrina para a obtenção do Título em
Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça.
Coorientador: Prof. Dr. Márcio Florian.

**LONDRINA
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

F866s Freitas, Lucas Augusto de

Síntese e caracterização de hidroxiapatita porosa com propriedades osteativas / Lucas Augusto de Freitas. - Londrina : [s.n.], 2020.
58 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça.

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Florian.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais.
Londrina, 2020.

Bibliografia: f. 56-58.

1. Hidroxiapatita. 2. Porosidade. 3. Enxerto ósseo. 4. Materiais biomédicos. I. Cabeça, Luís Fernando, orient. II. Florian, Márcio, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais. V. Título.

CDD: 620.11



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina



Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais

TERMO DE APROVAÇÃO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA POROSA COM
PROPRIEDADES OSTEOATIVAS**

Por

LUCAS AUGUSTO DE FREITAS

Dissertação apresentada no dia 28 de agosto de 2020 ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **APROVADO.**

Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça

(UTFPR - Programa De Pós-Graduação Em Ciência E Engenharia De Materiais – PPGCEM) Orientador

Prof. Dr. Carlos Eduardo Cava

(UTFPR - Programa De Pós-Graduação Em Ciência E Engenharia De Materiais – PPGCEM)

Prof. Dr. Cristiano Teodoro Russo
(PUC – PR)

Obs.: A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Luís Fernando Cabeça e Márcio Florian pela orientação inegavelmente eficiente e segura, valiosas sugestões e estímulos.

Aos professores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Londrina e Apucarana – pelo interesse e esforços em prol da pesquisa e do crescimento acadêmico da instituição.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, lugar onde passei os melhores anos da minha vida e que sempre apoiou seus alunos a crescer em conhecimento.

Aos amigos e funcionários do Mestrado, pela convivência e amizade, das quais jamais esquecerei.

Ao professor Avacir Andrello do Departamento de Física da Universidade Estadual de Londrina que realizou os testes de porosimetria.

Ao professor Mario Sérgio Mantovani do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Londrina que realizou os testes de citotoxicidade.

À Bruna pelo apoio, paciência e horas dedicadas sobre as atividades e provas que eu custava a entender.

Ao meu amigo Luís Felipe Ribeiro que me auxiliou durante o Mestrado.

À minha família pelo apoio e torcida constante.

E a minha mãe, por ser inspiração e alicerce de todas as etapas da minha vida.

RESUMO

FREITAS, Lucas Augusto de. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita porosa com propriedades osteoativas**. 2020. 58p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia dos Materiais – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2020.

A hidroxiapatita (HAP) é um composto baseado em fosfato de cálcio que pode ser extraído de tecido ósseo de animais ou sintetizado. Devido às suas propriedades de biocompatibilidade e bioatividade, tem notória aplicação nas áreas de implantes e enxertia óssea. Entretanto, a HAP apresenta desvantagens quanto a disseminação das células jovens, em virtude da sua baixa porosidade. Assim, o presente trabalho tem como objetivo sintetizar HAP com diferentes formadores de poros (moléculas orgânicas como PEC 1500, PVA e CMC) utilizando processos de mistura durante o processo de síntese (in situ) ou misturados após a HAP sintetizada (ex situ). O desenvolvimento visa um biomaterial com melhores características de osteocondução. Além deste, ao biomaterial também será adicionado o fármaco ácido zoledrônico para melhorar o processo de osteoativação celular. Os primeiros resultados após o processo de sinterização indicaram que o melhor formador de poros foi a molécula de PEG1500 através de um processo in situ (teste de MEV), gerando um material com vários poros com tamanho de médio de 1000 nm. O uso de secagem por spray dryer foi adotado para melhor padronização do tamanho do grão de HAP com ponteira de 1200 mm. Os testes de porosimetria indicaram existência predominante de vazios intergranulares e pequenos poros. Os ensaios de citotoxicidade confirmaram que a substância Ácido Zoledrônico é altamente tóxica em elevadas concentrações e deve-se buscar a concentração ideal.

Palavras-chave: Hidroxiapatita; biocerâmicas porosas; enxertia óssea; osteocondução; osteoindução.

ABSTRACT

FREITAS, Lucas Augusto de. **Synthesis and characterization of porous hydroxyapatite with osteoactive properties**. 2020. 58p. Thesis (Master's) - Postgraduate Program in Materials Science and Engineering - Federal Technological University of Paraná, Londrina, 2020.

Hydroxyapatite (PAH) is a calcium phosphate-based compound that can be extracted from animal bone tissue or synthesized. Due to its biocompatibility and bioactivity properties, it has a notorious application in the areas of implants and bone grafting. However, PAH has disadvantages regarding the dissemination of young cells, due to its low porosity. Thus, the present work aims to synthesize PAH with different pore builders (organic molecules such as PEC 1500, PVA and CMC) using mixing processes during the synthesis process (in situ) or mixed after the synthesized PAH (ex situ). The development aims at a biomaterial with better osteoconductive characteristics. In addition to this, the drug zoledronic acid will also be added to improve the process of cellular osteoactivation. The first results after the sintering process indicated that the best pore builder was the PEG1500 molecule through an in situ process (SEM test), generating a material with several pores with an average size of 1000 nm. The use of spray drying was adopted to better standardize the size of the HAP grain with a 1200 mm tip. The porosimetry tests indicated the predominant existence of intergranular voids and small pores. The cytotoxicity tests confirmed that the substance Zoledronic Acid is highly toxic in high concentrations and the ideal concentration should be sought.

Keywords: Hydroxyapatite; porous bioceramics; bone grafting; osteoconduction; osteoinduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da Hidroxiapatita	20
Figura 2 - Molécula de PVA (A), PEG-1500 (B) e Carboximetilcelulose (C).	24
Figura 3 - Ilustração de formação de poros por fugitivos de sacrifício.	26
Figura 4 - Células da Matriz Óssea	28
Figura 5 - Representação da Estrutura Química do Ácido Zoledrônico.	29
Figura 6 - Fluxograma de síntese da HAP	31
Figura 7 - Rampa de sinterização.	32
Figura 8 - DRX da amostra de hidroxiapatita	36
Figura 9 - Curva de TGA da amostra de HAP com 10 % de carboximetilcelulose. (A) - Temperatura versus massa em mg. (B) – Temperatura versus percentual de massa perdida.	37
Figura 10 - Curva de TGA da amostra de HAP com 10 % de PEG. (A) - Temperatura versus massa em mg. (B) – Temperatura versus percentual de massa perdida.....	37
Figura 11 - Curva de TGA da amostra de HAP com 10 % de PVA. Temperatura versus percentual de massa perdida.	38
Figura 12 - Imagens de MEV da Hidroxiapatita + PEG (10 % da massa de HAP) após a sinterização. (A e B) - In Situ. (C e D) - Ex Situ.....	39
Figura 13 - Imagens do MEV de HAP sintetizada e HAP onde foram utilizados 10 % dos formadores de poros. Amostra A e B - HAP pura. Amostra C e D - HAP + 10% de Carboximetilcelulose. FONTE: Autoria Própria.	40
Figura 14 - Imagens do MEV de HAP sinterizada e HAP onde foram utilizados 10 % dos formadores de poros. Amostra A e B - HAP + 10% de PVA. Amostra C e D - HAP + 10% de PEG.	41
Figura 15 - Gráfico de porosidade - Amostra 1. Intrusão de mercurio por diametro do poro.	43
Figura 16 - Gráfico de porosidade - Amostra 2. Intrusão de mercurio por diametro do poro.	44
Figura 17 - Imagens do MEV. Amostras de HAP após secagem por Spray Drying, (A e B) bico de 1,0 mm de diâmetro e (C e D) bico de 1,2 mm de diâmetro.....	46
Figura 18 - A) Placa de 48 poços com células V79 antes do tratamento de HAP/AZ (60% de confluência). B) Placas de 48 poços imediatamente após o tratamento com HAP/AZ. C) Placa de 48 poços após a adição de resazurina. D) Placa de 48 poços	

após 4h de adição da resazurina. E) Placa de 48 poços 24h após a adição de resazurida. F) Placa de 48 poços 72h após a adição de resazurida.	48
Figura 19 - Imagens de microscópio dos poços das amostras de HAP/AZ.....	49
Figura 20 - A) Placa de 48 poços com células V79 imediatamente após o tratamento com AZ. B) Placa de 48 poços após 24 h de tratamento com AZ. C) Adição de resazurina nos poços. D) Placa de 48 poços após 4h de adição da resazurina.	51
Figura 21 - Amostras do teste de citotoxicidade de AZ colocados em resazurina por A) 24h, B) 48 h e C) 72 h.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de HAP e AZ utilizados para os testes de citotoxicidade. .	34
Tabela 2 - Concentração de AZ utilizados para os testes de citotoxicidade.	35
Tabela 3 - Dados da porosimetria - Amostra 1	42
Tabela 4 - Dados de porosimetria - Amostra 2.....	43
Tabela 5 - Nomenclatura de dados de citotoxicidade (HAP + ZOD).	46
Tabela 6 - Quadro de disposição das amostras de HAP+AZ e controle positivo (MMS).	47
Tabela 7 - Tabela de valores médios de células encontrados nas amostras.	50
Tabela 8 - Quadro de disposição das amostras de AZ e controle positivo (MMS). ...	51
Tabela 9 - Tabela de valores médios de células encontrados nas amostras depois de 72 h.	53

SUMÁRIO

1.	Introdução	10
2.	Justificativa	12
3.	Objetivos	13
3.1.	Objetivos específicos.....	13
4.	Referencial Teórico	14
4.1.	ENXERTIA ÓSSEA E SUAS PROPRIEDADES.....	14
4.2.	Tipos de enxerto.....	16
4.3.	Enxertos sintéticos	17
4.4.	Hidroxiapatita.....	19
4.4.1.	Método de Partículas Voláteis	21
4.4.2.	Método de Mistura de Porogênios Solúveis em Água	22
4.4.3.	Método de Esqueleto de Corais Marinhos.....	22
4.4.4.	Método de Espuma de Cerâmica	23
4.4.5.	Método de esponja polimérica	23
4.5.	Osteoativação.....	26
5.	Materiais e Métodos	30
5.1.	Síntese da Hidroxiapatita	30
5.2.	Formadores de poros	30
5.2.1.	Formadores de poros através de reação <i>in situ</i>	30
5.2.2.	Formadores de poros através de reação <i>ex situ</i>	30
5.3.	DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX).....	31
5.4.	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	31
5.5.	SINTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	31
5.6.	MISCROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	32
5.7.	GRANULOMETRIA DAS PARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA.....	32
5.8.	ENSAIOS DE POROSIMETRIA DE MERCÚRIO.....	33
5.9.	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	33
5.9.1.	Ensaio de citotoxicidade do AZ na presença de HAP.....	33
5.9.2.	Ensaio de citotoxicidade com AZ.....	34
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
6.1.	ANÁLISE DE DRX.....	36
6.2.	ANÁLISE DE TERMOGRAVIMETRIA.....	37

6.3.	ANÁLISE DAS IMAGENS DO MEV	39
6.3.1.	Análise do método de Síntese <i>Ex Situ</i> e <i>In Situ</i>	39
6.3.2.	Avaliação da Melhor Molécula Orgânica para Formação de Poro	40
6.4.	POROSIMETRIA DE MERCÚRIO	42
6.4.1.	Avaliação da Morfologia do Grão da HAP	45
6.5.	TOXICIDADE DE ÁCIDO ZOLEDRONICO EM HIDROXIAPATITA	46
6.6.	TOXICIDADE DO ÁCIDO ZOLEDRONICO	50
7.	Conclusão	54
	REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

O tratamento de tecidos ósseos danificados do corpo humano é muitas vezes realizado pelo procedimento de substituição óssea ou enxertia óssea. Sua principal função é preencher os vazios de tecidos causados por doenças degenerativas e/ou genéticas, perdas relacionadas a fraturas ou contusões profundas que atinjam os ossos e até pela própria perda natural relacionada à idade avançada do paciente. Sendo assim, o tratamento pode ser utilizado em diferentes lugares do corpo, desde estruturas dentárias até crânio faciais. Este procedimento tem mostrado resultados promissores, alcançando a regeneração quase completa e reabsorção do material enxertado, mas para que o tratamento seja eficiente é preciso que o material enxertado possua características físico-químicas e cristalográficas semelhantes ao tecido ósseo. Um material que se destaca apresentando essas características é a hidroxiapatita (HAP). HAP é um material a base de fosfato de cálcio que compõe a maioria da estrutura inorgânica do osso e conseqüentemente é o mais utilizado neste tipo de tratamento quando se opta pelo composto sintético (DUTTA et al., 2015.)

A hidroxiapatita sintetizada, embora apresente similaridades químicas ao tecido ósseo, possui também aspectos estruturais que dificultam a disseminação das células jovens, como exemplo a baixa porosidade. É preciso que o material enxertado tenha poros interligados para que as células de geração de tecido ósseo, conhecidas como osteoblastos, possam infiltrar no material, consumi-lo e crescer na estrutura como um todo (PARSONS ET AL., 1988). Logo, além de sintetizar a HAP, é preciso utilizar métodos de geração de poros, criar vazios no material de maneira a maximizar a capacidade de proliferação celular e não prejudicar as propriedades mecânicas: o enxerto deve aderir-se ao local sem perdas de material, apenas assim o composto poderá interagir com o organismo de maneira adequada. Para gerar esses poros existem diferentes técnicas e compostos capazes de arear a hidroxiapatita, criar sulcos e interligá-los. Neste trabalho serão utilizados diferentes compostos orgânicos (Polietileno Glicol, Acetato de Polivinila e Carboximetilcelulose) que serão integrados à HAP durante o processo de síntese (processo *In Situ*) ou por mistura física após a síntese (processo *Ex Situ*). Durante o processo de sinterização da HAP esses componentes orgânicos serão queimados e abandonam a estrutura por evaporação, logo os espaços vazios deixados por eles darão origem aos poros. O material será

caracterizado quanto à formação de poros utilizando microscopia eletrônica de varredura.

Os poros gerados darão propriedades osteocondutivas em função da área superficial aumentada no material sintetizado. Entretanto, a intenção é o desenvolvimento de matérias que além de propriedades osteocondutivas também tenham ação osteoindutoras. Pesquisas demonstram que enxertos sintéticos ainda não se comportam de maneira tão eficiente quanto o enxerto autógeno, onde o composto para o tratamento é retirado diretamente do paciente em uma área distinta àquela que sofreu perda de tecido ósseo (YAMAN ET AL., 2017). Sabe-se que compostos bifosfanatos tem uma grande afinidade com células ósseas e que estimulam a multiplicação celular. Assim, pesquisas vêm sendo realizadas para agregar as propriedades da hidroxiapatita e dos bifosfanatos e tornar o tratamento de enxertia óssea sintética mais eficiente (LU ET AL., 2018).

Sendo assim, este estudo visa sintetizar o composto hidroxiapatita com porosidade controlada e adicionar um fármaco bifosfanato para ativar as células jovens e melhorar o desempenho do material.

2. JUSTIFICATIVA

A regeneração do tecido ósseo utilizando biomateriais sintéticos é uma alternativa aos enxertos ósseos, pois não danificam o leito hospedeiro e não expõe a risco de contaminações. Apresentam ainda a vantagem de serem disponibilizados comercialmente em quantidade ilimitada, diferente dos enxertos autógenos. O sucesso na reparação está na dependência de certas condições, tais como, possuir um amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional e tamanho da lesão (SALLUM, CICARELI, *et al.*, 2010)

É vasta a quantidade de referências que endossam a aplicação da hidroxiapatita em enxertos ósseos além de ampla variedade de aquisição e sinterização deste material (SOPYAN ET AL., 2007) TSAI *et al.*, 2018); (VINOGRADOV, 2015); (DUTTA *et al.*, 2015); (FONSECA *et al.*, 2011); (LOCA *et al.*, 2011); (FOOK *et al.*, 2009;); (SOPYAN; KAUR, 2009); (SEPULVEDA *et al.*, 2002).

A hidroxiapatita é uma alternativa da enxertia óssea interessante por apresentar menor custo que a enxertia heterógena e menos invasiva que a enxertia autógena.

Desta forma, o presente trabalho se justifica pela possibilidade de inovar no desenvolvimento de um composto biocerâmico a partir da melhoria da porosidade da hidroxiapatita para enxertia óssea além da adição de um fármaco conhecido no tratamento de osteoporose para ativação celular e melhoramento da eficiência do processo de crescimento ósseo.

3. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é a síntese de hidroxiapatita porosa carregada com o fármaco ácido zoledrônico.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar a hidroxiapatita, utilizando método de co-precipitação, a partir de CaO e KH_2PO_4 com diferentes moléculas orgânicas para a formação do poro: polietileno glicol (PEG), acetato de polivinila (PVA) e carboximetilcelulose (CMC);
- Duas metodologias de síntese serão realizadas para avaliar a eficiência de formação de poros: *in situ* e *ex situ*;
- Avaliar o melhor método de síntese para formação de poros;
- Avaliar a melhor molécula orgânica para formação do poro;
- Caracterizar a morfologia e microestrutura da hidroxiapatita através de difração de Raios X e microscopia eletrônica de varredura;
- Ensaio de citotoxicidade *in vitro*;
- Ensaio de porosimetria.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. ENXERTIA ÓSSEA E SUAS PROPRIEDADES

O osso é constituído por um tecido conjuntivo especializado, vascularizado e dinâmico que se modifica ao longo da vida do organismo. Quando lesado, possui uma capacidade única de regeneração e reparação sem a presença de cicatrizes, mas em algumas situações, devido ao tamanho do defeito, o tecido ósseo não se regenera por completo. Assim, se faz necessária a realização de procedimentos de enxertia óssea (FARDIN, JARDIM, et al., 2010).

O enxerto ósseo se realiza por meio de um procedimento cirúrgico que visa aumentar ou reconstruir tecido ósseo danificado, tem ampla aplicação desde reparação da estrutura dentária e maxilar até correções de perda óssea em quadril e articulações. Na odontologia o enxerto visa o aumento de altura e espessura do osso, restabelecendo a quantidade óssea necessária para a instalação de implantes dentários.

Os primeiros estudos e procedimentos envolvendo enxertos ósseos datam de 1682, quando Van Meeken transplantou com sucesso um osso craniano de uma cachorra para corrigir uma falha óssea no crânio de um ser humano. Após muitos estudos sobre as propriedades e deficiências, tanto do tecido ósseo como da cirurgia em si, Philip Walter, em 1821, foi pioneiro na prática da cirurgia óssea autógena, onde a matéria orgânica utilizada foi parte do próprio osso do paciente para reconstrução de defeitos ósseos. A partir de então muitas pesquisas e experimentos foram desenvolvidos nessa área, sempre buscando a melhor opção de material, dentre eles encontra-se enxertos extraídos de diferentes fontes, seja ela do mesmo indivíduo a ser enxertado, de um indivíduo diferente, mas da mesma espécie (comumente de bancos de ossos humanos), de um indivíduo de espécie diferente (bovino ou suíno, por exemplo), e sintéticos onde o material é produzido em laboratório visando aproximar-se ao máximo das características de um osso natural. Essa seria a principal divisão dos enxertos. Dentre as diferenças, todos devem interagir com o tecido ósseo de forma a coexistir e com o decorrer do tempo serem substituídos por tecido ósseo do receptor (OLIVEIRA ET AL., 2010).

A forma de interação entre material e tecido também caracteriza um tipo de classificação, são esses: osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores.

Os osteogênicos referem-se a materiais de enxerto capazes de estimular a formação de osso por si só, sem depender das células do receptor. Logo, essa é uma característica que somente o enxerto com osso autógeno possui. Os osteoindutores são aqueles capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, presentes na área receptora a se transformar em uma célula formadora de osso, conhecido como osteoblasto. Esta propriedade está relacionada à presença do grupo de proteínas ósseas morfogênicas (BMP), os quais não têm sido associadas aos biomateriais para enxerto, pois podem causar uma resposta imune. Os materiais osteocondutores (geralmente inorgânicos, como o caso das hidroxiapatitas) tem a capacidade de servir de arcabouço para a migração de células ósseas (osteoblastos) (SOARES, 2015).

A escolha de um material para o enxerto depende de alguns fatores importantes, apesar de não existir um único tipo ideal e sem desvantagens em sua aplicabilidade ou aquisição. Segundo VOLKMER (2006) todo enxerto deve obedecer aos seguintes requisitos:

- 1) Fornecimento ilimitado de matéria prima para o enxerto;
- 2) Não apresentar resposta imunológica do hospedeiro;
- 3) Revascularizar rapidamente;
- 4) Estimular a osteoindução;
- 5) Promover a osteocondução;
- 6) Ser substituído completamente por osso em quantidade e qualidade semelhante ao do hospedeiro.

A partir dessas condições o profissional da área deve selecionar um tipo de enxerto ósseo adequado a determinada situação, deve considerar o local do enxerto, as condições do paciente e o tamanho do defeito a ser preenchido sempre visando o melhor para o paciente.

4.2. TIPOS DE ENXERTO

Dentre os tipos de enxertos conhecidos podemos dividi-los segundo o local de extração do material. Assim são classificados como autógenos, homógenos, heterógenos e sintéticos.

O osso autógeno (obtidos do próprio indivíduo) é consagrado na literatura mundial como o que consegue reunir características mais próximas do ideal. Possui como principal vantagem seu potencial de integração ao sítio receptor com mecanismos de formação óssea de osteogênese, osteoindução e osteocondução. Sua principal desvantagem é a necessidade de uma área doadora advinda do próprio indivíduo. Esse por sua vez, está propenso a infecções, edemas e hematomas e na área receptora uma dificuldade de adaptação, além do desgaste físico do paciente pela invasibilidade do procedimento cirúrgico e limitada quantidade de material em casos de grandes reconstruções (SANTOS, GULINELLF, *et al.*, 2009).

Em seguida, existem os implantes homógenos ou alógenos (obtidos de indivíduos com carga genética diferente, porém da mesma espécie), o tecido ósseo é adquirido em bancos de ossos que por sua vez captam o material de indivíduos mortos ou vivos que sofreram amputação de membros e por qualquer motivo não comprometeram o estado saudável do tecido. Os maiores problemas desse tipo de enxerto são a rejeição, risco de forte reação antigênica, transmissão de doenças infecciosas e exigência de adequação entre doador e receptor do tecido ósseo (SOUZA, JR, *et al.*, 2010).

Outra classe muito utilizada são os heterógenos, enxertos em que doador e receptor são de espécies distintas. Ossos bovinos mineralizados (OBM) são utilizados neste procedimento há muitos anos e com enorme sucesso, pois produzem uma formação muito semelhante ao osso medular humano, com grau de porosidade que varia entre 75% a 80% o que permite boa capacidade de incorporação ao tecido. Esses tipos de enxerto são completamente desprovidos da fase proteica e por sua matriz óssea não ser modificada do seu formato original ele é reabsorvível, denso ou poroso, cristalino ou amorfo. Apesar da semelhança com algumas hidroxiapatitas, sua composição à base de apatita é predominantemente composta por carbonatos e grupos hidroxílicos reduzidos. Isso torna o material especificamente distinto, apresentando propriedades osteoindutivas, servindo como arcabouço para a neoformação óssea (SOUZA, JR, *et al.*, 2010). No entanto, devido ao rigoroso

tratamento do enxerto para prevenir a rejeição e as dificuldades na extração do material, esta alternativa acaba tornando-se economicamente menos atrativa, assepsia e sinterização acabam encarecendo o processo.

Por fim, os substitutos ósseos sintéticos ou aloplásticos (produzidos a partir de metais, cerâmicas ou polímeros) são os materiais e técnicas alternativas que através de estudos especializados vem ganhando espaço no meio da enxertia óssea. Esse fato se dá, principalmente, pela maior disponibilidade de matéria prima, menos invasiva e prejudicial à saúde do paciente por dispensarem o procedimento cirúrgico de retirada de material ósseo e também apresentam menor custo de fabricação (OLIVEIRA, OLIVEIRA, *et al.*, 2010). Assim, os substitutos sintéticos são a opção lógica quando se busca atender à demanda cada vez maior de implantes ortopédicos, mesmo considerando suas limitações de força, osteocondução, osteoindução, oteointegração e biodegradação inerentes a sua natureza. Sento esta tipologia de enxertia óssea definido como objeto de estudo do presente trabalho.

4.3. ENXERTOS SINTÉTICOS

Como foi citado, existem tipos diferentes de enxertos ósseos e uma das classificações utilizadas relaciona a origem dos materiais do enxerto. Nesta classificação o enxerto autógeno destaca-se pela maior atividade celular e eficiência já que a matéria prima é retirada diretamente do paciente que receberá o enxerto.

Segundo (CANULLO; DELLAVIA, 2009) a utilização desse tipo de enxerto em blocos ou grânulos foi por muito tempo considerado como a melhor opção, no entanto outros tipos de materiais de enxerto devem ser desenvolvidos com intuito de evitar um segundo procedimento cirúrgico, necessário para a retirada do material, e assim diminuir a morbidade da área doadora.

Ao longo do tempo e do desenvolvimento das técnicas de enxertia óssea, muitos sistemas aprimorados foram desenvolvidos. O aprimoramento de materiais com *Scalffolds* ou poros interligados foi proposto para a engenharia de tecidos ósseos. A partir desses sistemas uma serie de pesquisa foram desenvolvidas em busca de inovações para enxertia sintética: seleção de materiais, incorporação de medicamentos e fatores de crescimento, estabilidade mecânica e eficiência de regeneração óssea (SARKAR; LEE, 2015). Entretanto, substitutos sintéticos

apresentam desempenho osteogênico ou osteoindutivo significativo, mas não equivalente ao material autógeno.

Portanto, um dos aspectos importantes no desenvolvimento de materiais substitutos de ossos e órgãos é a fabricação de matrizes ou andaimes de suporte com uma morfologia estrutural micro e macroscópica apropriada, incluindo tamanho de poros, interconectividade de poros, biocompatibilidade, osteocondutividade, resistência mecânica e biodegradabilidade (PRASADH; WONG, 2018).

- Andaimos para crescimento ósseo
- Porosidade
- Propriedades mecânica
- Características da Degradação

As estruturas Scalfod ou andaimes tem objetivo de apoiar os novos tecidos enquanto serve de substrato ao crescimento ósseo, estes devem possuir recursos específicos para um crescimento favorável. A topografia do biomaterial deve promover adesão celular, infiltração celular e o crescimento, isso significa que essas estruturas devem possuir poros bem interconectados que permitem a infiltração celular e a troca de nutrientes. Qualquer biomaterial que suporte a fixação de células e o crescimento ósseo em sua superfície é considerado osteocondutor. A taxa de degradação do biomaterial também é uma característica muito crucial, o biomaterial deve sofrer reabsorção à medida que o osso é formado, ou seja, a taxa de formação do novo tecido ósseo deve ser proporcional à taxa de degradação do biomaterial, e seus subprodutos de degradação não devem causar inflamação ou toxicidade nos tecidos circundantes ou em todo o sistema.

Novos materiais têm sido desenvolvidos e testados sob inúmeras e complexas formas. Dentre eles podemos citar: dura mater, cartilagem, dentina, osso- liofilizado ou não, e biomateriais à base de fosfato de cálcio (SOARES, 2015).

Na linha de fosfatos de cálcio, os principais exemplos são o Beta-fosfato-tricálcio e hidroxiapatita: biocompostos conhecido pela excelente biocompatibilidade e osteocondução, devido a sua composição quimicamente semelhante a apatita humana (DOROZHKIN, 2010). Outro material muito pesquisado nessa área são os biovidros, compostos constituídos por SiO_2 , Na_2O e P_2O_5 , sua principal propriedade é proporcionar absorção e concentração de proteínas usadas pelas células de

regeneração óssea para formar a matriz celular a qual, teoricamente, pode promover a formação óssea (LINDHE J, KARRING T, LONG NP, 2005).

Dentre os variados tipos de material utilizados para enxertia óssea a hidroxiapatita sintética é um dos mais utilizados, o composto constituído de fosfato de cálcio compõe a maioria da parte inorgânica do tecido ósseo (DUTTA ET AL., 2015).

4.4. HIDROXIAPATITA

Dentre os compostos a base de fosfatos de cálcio a hidroxiapatita sintética utilizada na reposição óssea tem, em geral, ótima biocompatibilidade. A hidroxiapatita (HAP) é um material inorgânico natural que compõe cerca de 95% do tecido mineralizado de ossos e dentes em humanos e vertebrados (JARDIM et al. 2009). Largamente utilizada em tratamentos envolvendo o tecido ósseo justamente por sua excelente afinidade a substâncias biológicas como colágeno, proteínas, enzimas e células (KHAJURIA; RAZDAN; MAHAPATRA, 2015).

A HAP é representada pela estrutura química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Figura 1) compõe o esqueleto dos vertebrados pela capacidade de atuar como reserva de cálcio e fósforo. HAP presente no esqueleto também apresenta em sua composição íons tais como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{2+} e CO_3^{3-} permitindo o controle desses importantes íons nos líquidos corporais através da sua liberação ou armazenamento (GUTIERRES ET AL., 2005).

A superfície da hidroxiapatita permite a interação das ligações do tipo dipolo, fazendo com que as moléculas da água, proteínas e colágeno sejam absorvidas na superfície o que induz a regeneração tecidual.

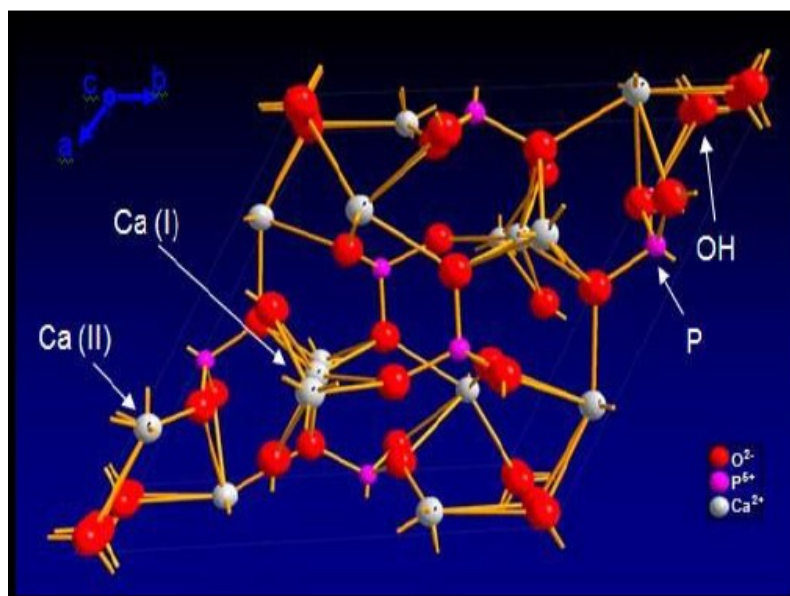
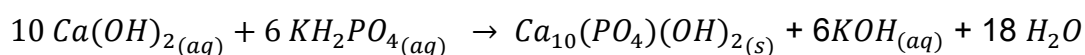


Figura 1 - Estrutura química da Hidroxiapatita
 FONTE: (GUTIERRES et al., 2005).

Sua semelhança química com os ossos e dentes (Figura 1) dos vertebrados tem motivado pesquisadores a desenvolver e melhorar este biomaterial como seus substituintes. Quando colocada em contato com o osso, atua inicialmente como uma prótese e, em seguida, como um suporte para a regeneração dos tecidos (SALLUM, CICARELI, *et al.*, 2010).

A HAP pode ser sintetizada utilizando o método úmido de co-precipitação, consistindo na reação de uma fonte de fósforo com uma fonte de cálcio em um pH controlado (ARCOS, 2014), sabendo-se que a razão Ca/P da HAP é de 1,67 (ARCOS, 2014), é possível escrever sua reação de síntese que indicando as quantidades de reagentes a serem utilizados, tais como:



Apesar das vantagens da utilização da hidroxiapatita na enxertia óssea, HAP possui as desvantagens em termos de propriedade de osteocondução, devido ao processo de sinterização do material. Este possui uma porosidade baixa (muito menor que o enxerto heterógeno), dificultando a formação óssea natural do paciente o que aumenta o tempo de cuidados pós-operatório, propensão infecciosa, rejeição e desacoplamento do material além de incômodos e dores sofridas pelo indivíduo (ROSA, SHAREEF e NOORT, 2000).

Diante da dificuldade em osteocondução da hidroxiapatita em função da baixa porosidade, a presente pesquisa busca desenvolver um composto com propriedades porosas mais favoráveis à enxertia óssea.

A HAP porosa possui uma ligação ideal ao tecido ósseo. Os poros fornecem um intertravamento mecânico que fixa o material, assim, o tecido cresce dentro dos poros aumentando a resistência do implante. Percebeu-se que a dimensão e a morfologia dos poros são fatores cruciais para uma excelente osteointegração. O tamanho mínimo de poro necessário para permitir o crescimento do osso e ao mesmo tempo a passagem de corrente sanguínea é de aproximadamente 100–150 μm para macroporos (HABIB et al., [s.d.]), mesmo assim, a osteocondução ainda acontece mesmo com poros de cerca de 50 μm . Alguns relatos afirmam ainda que para a excelente colonização de osteoblastos e crescimento fibroso-muscular, os poros deveriam ser de 200 a 500 μm . Outros requisitos importantes para implantes porosos são a interconectividade dos poros para a penetração das células semelhantes a osteoblastos no interior dos poros, bem como a rugosidade da superfície para a fixação das células (SOPYAN; KAUR, 2009).

As características físicas obtidas no desenvolvimento de cerâmicas porosas para substitutos ósseos dependem do volume poroso dos biomateriais, bem como do tamanho médio dos poros e das interconexões. Um desenvolvimento bem-sucedido de substitutos ósseos porosos com propriedades ideais requer controle perfeito desses parâmetros (SOPYAN et al., 2007).

A grande diversidade de requisitos de reconstrução clínica para os defeitos do esqueleto levou ao desenvolvimento de vários métodos para preparar implantes cerâmicos porosos. Isso permite a produção de HAP porosa com porosidade controlada, boa interconectividade porosa, resistência mecânica e propriedades da superfície. Alguns desses métodos podem ser brevemente explicados da seguinte maneira:

4.4.1. Método de Partículas Voláteis

Vários tipos de agentes de produção de poros, incluindo parafina, naftaleno, carbono, amido, farinha, peróxido de hidrogênio ou polímeros sintéticos (por exemplo, polivinil butiral) são misturados a pós ou polpas de HAP.

Após a moldagem, os orgânicos são queimados durante a sinterização. Essa abordagem permite o controle direto sobre as características dos poros, já que sua fração, tamanho, morfologia e distribuição são controladas por tipo, quantidade e propriedades da fase volátil adicionada.

A remoção de orgânicos que criam poros pode ser realizada por processos físicos como vaporização e sublimação ou reações químicas como combustão e pirólise (SCHLGL, 2008). Segundo o mesmo as cerâmicas porosas obtidas geralmente têm macroporos fechados com um tamanho de poro variado de 0,1-5000 μm de diâmetro.

4.4.2. Método de Mistura de Porogênios Solúveis em Água

Este método foi desenvolvido por (TADIC et al., 2004) e consiste na mistura de cristais de sal e polímeros solúveis em água como agentes de criação de poros com pós de fosfato de cálcio, seguidos de prensagem isostática a frio. Como os porogênios são facilmente solúveis em água, eles podem ser removidos sem qualquer tratamento térmico. Os poros são formados pelos cristais de sal e os canais entre esses poros são formados pelas fibras poliméricas. A HAP porosa obtida apresentou boa interconectividade com os diâmetros de poros na faixa de 250 a 400 μm .

4.4.3. Método de Esqueleto de Corais Marinhos

A estrutura esquelética tridimensional de certos corais marinhos imita o osso esponjoso humano e pode ser usada como modelo para a construção de estruturas porosas.

Nesse método, a reação de troca hidrotérmica converte o carbonato de cálcio no esqueleto de coral em HA na presença de íons fosfato. O hidrogeno fosfato de amônio é normalmente usado como fonte de íons fosfato.

A HAP porosa resultante possui macroporos de cerca de 200 a 500 μm de diâmetro, com boa interconectividade e porosidade de 50 a 65%, e esses são fatos suficientes para sua utilidade na obtenção de substitutos ósseos artificiais. No entanto, a quantidade limitada de coral marinho é seu obstáculo. Outro fator que deve ser considerado é a dificuldade em controlar a porosidade. Diversas espécies coralinas têm porosidades esqueléticas diferentes.

4.4.4. Método de Espuma de Cerâmica

Esta técnica envolve a formação de espuma de suspensões cerâmicas ou o inchamento de corpos verdes cerâmicos através de reações químicas de evaporação de gases de fontes orgânicas e inorgânicas.

Alguns agentes espumantes testados foram peróxido de hidrogênio, sal de carbonato e fermento em pó. Eles foram adicionados às pastas de HAP, enquanto agitavam para deixá-la espumar, e depois submetidos à polimerização seguida de sinterização (KIM et al., 2003).

Esta técnica envolve uma etapa de polimerização de reticulação que gelatiniza a pasta de HAP semelhante a espuma de maneira rápida, promovendo assim a formação de uma estrutura porosa interconectada. A superfície da parede do dispositivo obtido é muito lisa e as partículas de HAP são alinhadas estreitamente umas às outras e ligadas firmemente. Com tamanho médio de poros de 150 µm, este dispositivo é favorável à migração celular entre os poros ou ao crescimento de tecidos. A fundição em gel de espumas pode ser aplicada para produzir andaimes de cerâmica com alta resistência mecânica. A desvantagem desta técnica é que ela normalmente resulta em uma estrutura de poros mal interconectados e distribuição de tamanho de poro não uniforme (DE SOUZA et al., 2016).

4.4.5. Método de esponja polimérica

Outra abordagem para a fabricação de cerâmica porosa é através da replicação de um substrato de esponja polimérica para produzir cerâmica porosa de célula aberta reticulada. A cerâmica porosa obtida a partir de substratos poliméricos reticulados possui várias propriedades distintas, como tamanho de poro controlável e formas cerâmicas complexas, adequadas para diferentes aplicações (POLLICK et al., 1995). O método de esponja polimérica, como esse método denominado, é realizado impregnando substratos poliméricos porosos (esponjas) com pasta de HAP. A HAP porosa preparada pelo método de esponja polimérica mostrou poros bem interconectados, mas baixa resistência mecânica para aplicações de suporte de carga. Foi demonstrado que o método da esponja polimérica resulta em uma distribuição adequada do tamanho dos poros, conforme requer a osteocondução. Isso

é caracterizado pela existência de micro/meso/macroporos com um grau adequado de interconexão (TAMPIERI et al., 2001).

O uso de suspensão de HAP bem controlada permite fazer cerâmicas de HAP com gradientes de cristalinidade e porosidade imitando as características físico-químicas dos ossos corticais e esponjosos, além de fabricar enxertos porosos de HAP para administração controlada de drogas (GUICCIARDI et al., 2001).

O método utilizado no projeto será o método de partículas voláteis, em função da facilidade e rapidez de preparo. Para formação da porosidade na hidroxiapatita serão utilizados compostos orgânicos que após a pirólise geram as porosidades e não deixam resíduos provenientes da pirólise.

Optou-se pela utilização do material orgânico o poliacetato de vinila (PVA), o polietileno glicol (PEG1500) e carboximetilcelulose (CMC) (Figura 2), (Método de Partículas Voláteis).

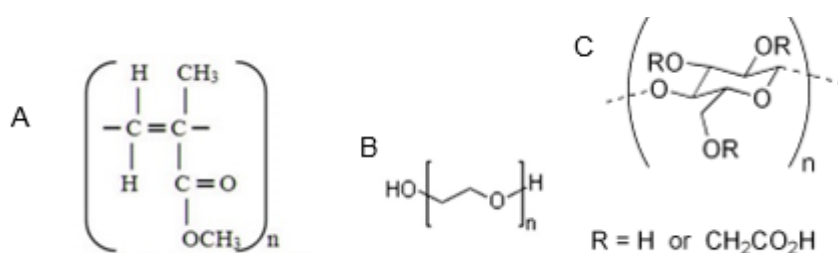


Figura 2 - Molécula de PVA (A), PEG-1500 (B) e Carboximetilcelulose (C).
FONTE: A autoria Própria.

Para a formação de poros constatamos que era necessário um composto com propriedades específicas. Como o material seria submetido a uma alta temperatura para que os compostos de sacrifício fossem retirados formando os poros, esse composto deveria ter um ponto de degradação mais baixo que o ponto do substrato (HAP). Este deveria também não interagir quimicamente com a Hidroxiapatita pois a estrutura da mesma é essencial para interação com o tecido ósseo. E por fim os formadores deveriam ter tamanhos de moléculas e estruturas adequadas ou razoáveis a aplicação, ou seja, grandes o suficiente para formar os poros e possibilitar o acesso das células, mas não tão grande que destruiria essa estrutura porosa.

Segundo (ASHRAF; ZEBARJAD; HADIANFARD, 2019) a engenharia de tecidos busca aprimorar os métodos, técnicas e meios de crescimento celular e proliferação em matrizes específicas, conhecidas como *scaffolds*. As propriedades

dos scaffolds dependem não apenas do material, mas também do tamanho e distribuição dos poros, biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade. Outro ponto-chave é a escolha dos materiais adequados. Além dos materiais convencionais, os polímeros sintéticos e biodegradáveis podem ser utilizados na fabricação de andaimes tridimensionais devido às suas vastas propriedades.

O primeiro composto utilizado foi o PEG. O poli (etileno glicol) (PEG) é um tipo importante de polímero hidrofílico, possui excelentes propriedades físico-químicas e biológicas, incluindo hidrofiliabilidade, solubilidade em água e em solventes orgânicos, falta de toxicidade, e ausência de antigenicidade e imunogenicidade. Essas propriedades permitem que o PEG seja usado para muitas aplicações biomédicas e biotecnológicas, e o PEG é considerado um biomaterial muito importante. (FU et al., 2011; KOUPAEI; KARKHANEH; DALIRI JOUPARI, 2015)

Como segunda opção optamos pelo PVA. O álcool polivinílico (PVA) é um dos polímeros sintéticos mais famosos e de baixo preço, facilmente solúvel em água devido ao seu grupo funcional de álcool (ASHRAF; ZEBARJAD; HADIANFARD, 2019). O PVA contém numerosos grupos de álcool polar e pode formar ligações de hidrogênio com a água. Portanto, dissolve-se facilmente na água. O PVA também é um material biodegradável que foi usado na engenharia de tecidos em inúmeros métodos como eletrospinning para formar *scaffolds* nanofibrosos, liofilização e filtração de partículas por moldagem em fusão (HSIEH; LIAU, 2013).

E por último optamos pela carboximetilcelulose (CMC). A CMC tem recebido cada vez mais atenção devido à sua boa resistência mecânica, além de excelente biocompatibilidade, estabilidade química, não toxicidade, baixo custo e fácil fabricação em várias morfologias com porosidade de interconexão ajustável. Além disso, as nanoestruturas de HA com alta área superficial específica e átomos insaturados podem interagir efetivamente com a celulose, resultando nas propriedades aprimoradas de seus nanocompósitos (FU et al., 2018).

Uma das técnicas de formação de poros em materiais cerâmicos consiste em misturar quantidades apropriadas de compostos que agiriam como fugitivos de sacrifício: agentes formadores de poros que ao elevar-se a temperatura da mistura seriam evaporados durante a sinterização, formando poros. São geralmente classificados como matéria orgânica sintética (polímero, fibras orgânicas, etc.), matéria orgânica natural (amido de batata, celulose, algodão, etc.), matéria metálica e inorgânica (níquel, carbono, cinzas volantes, partículas de vidro, etc.) e líquido

(água, gel, emulsões, etc.). Essa metodologia é útil especialmente para obter alta porosidade aberta, ou seja, os poros serão interconectados uns aos outros, formam túneis dentro do material o que facilita a atividade celular, aumenta sua eficiência e acelera o processo de crescimento ósseo (Figura 3). Os agentes, no entanto, precisam ser misturados homogêneoamente com pó de cerâmica para obter distribuição uniforme e regular dos poros. Fugitivos sólidos, como materiais orgânicos, são geralmente removidos por pirólise, o que requer tratamento térmico a uma temperatura acima de seu ponto de vaporização, assim o composto orgânico desprende-se do substrato formando os poros (OHJI; FUKUSHIMA, 2012).

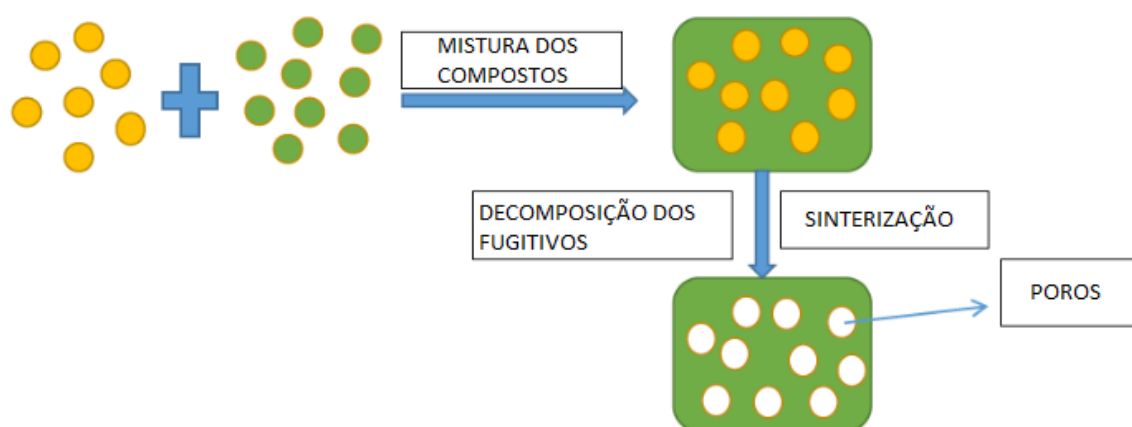


Figura 3 - Ilustração de formação de poros por fugitivos de sacrifício.
FONTE: (Ohji; Fukushima 2012).

Com a retirada dos materiais orgânicos, espera-se que os poros gerados sejam controlados em termos de tamanho e forma e que apresentem interconectividade, condição ideal para que a osteocondução sejam obtidas na HAP.

O aumento da porosidade no material induz as células para o interior do enxerto o que conseqüentemente aumenta o contato entre célula e substrato o suficiente para o crescimento ósseo, ainda sim, este é um processo lento e estressante ao paciente. A partir dessa problemática o estudo volta-se aos compostos capazes de ativar as células de crescimento e diminuir o tempo de cura do material.

4.5. OSTEOATIVAÇÃO

Segundo JUNQUEIRA E CARNEIRO (2004) o osso é um tecido multifuncional, metabolicamente muito ativo, constituído por uma população

heterogênea de células, em diferentes estágios de diferenciação celular. Está em equilíbrio dinâmico, com regulação da mobilização e deposição mineral, durante a vida do animal. É um tecido que sofre um processo contínuo de renovação e remodelação. Esta atividade é consequência, em sua maior parte, da atividade de dois tipos celulares principais, característicos do tecido ósseo: os osteoblastos e os osteoclastos.

Os osteoblastos são responsáveis principalmente pela deposição de colágeno e cálcio assim gerando tecidos novos a partir da superfície. São células diferenciadas que produzem a matriz óssea e também participam da calcificação da matriz, através da secreção de pequenas vesículas ricas em fosfatase alcalina para o interior desta, durante o período em que a célula está produzindo a matriz óssea (JONHSON, 2000).

Já os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea. São células grandes (Figura 4), que surgem pela fusão de células mononucleadas e podem ter até 50 núcleos. Acredita-se que os precursores dos osteoblastos se originam na medula óssea e migrem pela circulação, a partir do timo e outros tecidos retículo-endoteliais, para os sítios do osso destinados à reabsorção. Os precursores mononucleados dos osteoclastos são provavelmente atraídos para os sítios de reabsorção óssea por produtos parcialmente degradados do osteóide. A parte do osteoclasto que entra em contato com o osso se apresenta altamente pregueada e é chamada de borda estriada. Esta varre a superfície do osso alterando sua configuração, à medida que liberam ácidos e enzimas hidrolíticas que dissolvem a matriz proteica e os cristais de minerais. Quando a reabsorção é completada, os osteoclastos são inativados e perdem alguns de seus núcleos. A inativação compreende a fissuração da célula polinucleada gigante, de volta a células mononucleadas (JOHNSON, 2000).

Assim, os estudos de ativação do crescimento de tecido ósseo buscam aprimorar essa dinâmica envolvendo as atividades dos osteoblastos e osteoclastos onde, os osteoblastos trabalham na reparação dos ossos que os osteoclastos desfizeram. Esse equilíbrio é extremamente importante porque os ossos são reserva de sais minerais como cálcio e magnésio. Nesse sentido, encontra-se uma classe de medicamentos conhecida como bifosfanatos. A principal função dos bifosfanatos é inibir a reabsorção óssea, ou seja, impedir a atividade dos osteoclastos. Como a interação entre as células de manutenção e deposição de tecido é cíclica, as células de crescimento são ativadas após a apoptose das células de reabsorção o que faz

dos bifosfanatos substâncias capazes de incitar a geração de tecido ósseo (DOGGRELL, 2009).

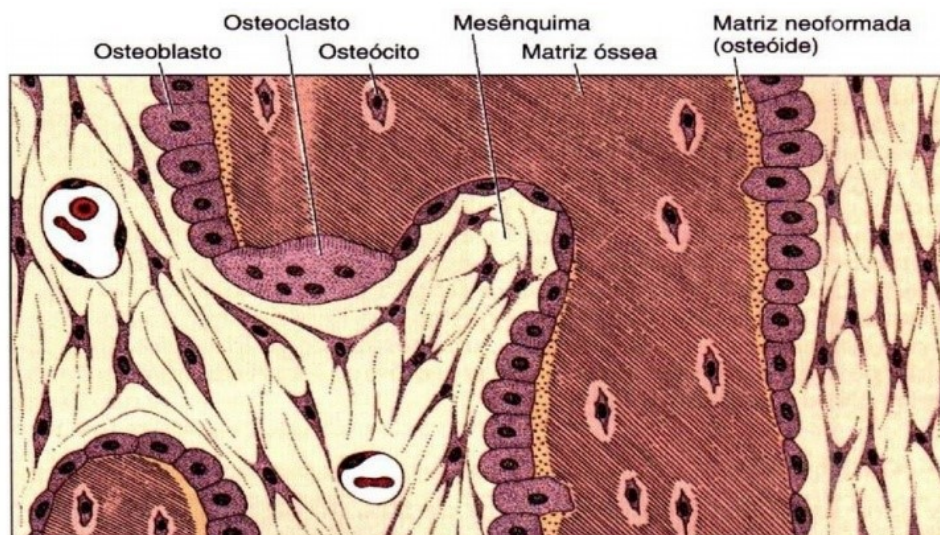


Figura 4 - Células da Matriz Óssea
FONTE: Junqueira e Carneiro, 2004.

Bifosfanatos é uma classe de compostos sintéticos relacionados estruturalmente aos pirofosfatos, possuem alta afinidade aos compostos de fosfato de cálcio como a hidroxiapatita. Assim, após administração intravenosa ou oral são rapidamente depositados nas superfícies de tecido “duro” como ossos e dentes (regiões ricas em hidroxiapatita). Esse processo faz dos bifosfanatos uma estratégia válida para o tratamento de doenças como a osteoporose primária, a secundária e a doença de Paget (PIGNATELLO ET AL. (2009).

Verificou-se que, em condições que estimulam a ligação do bifosfanato ao osso, o ácido zoledrônico (AZ) (Figura 5) tem maior afinidade de ligação entre todos os outros bisfosfonatos para HAP (KHAJURIA ET AL., 2015). AZ é um potente bifosfanato que inibe ativamente a proliferação de osteoclastos, reduz o risco de fraturas em pacientes com condições pós-menopáusicas e, portanto, é usado no tratamento da osteoporose (CAI ET AL., 2018).

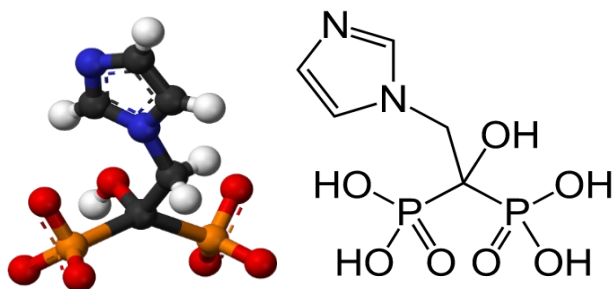


Figura 5 - Representação da Estrutura Química do Ácido Zoledrônico.
FONTE: Wikipedia.com

Assim, selecionamos o ácido zoledrônico como fármaco de ativação celular devido a sua alta afinidade ao tecido ósseo. Logo, o trabalho propõe o desenvolvimento de um biomaterial a base de hidroxiapatita porosa carregada com ácido zoledrônico com intuito de acelerar o processo de crescimento ósseo melhorando aspectos de multiplicação e atividade celular.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA

O método da co-precipitação consiste de simples etapas: primeiramente adiciona-se 200 ml água destilada em óxido de cálcio (2,79 g) como precursor de cálcio. Em seguida uma solução de fosfato de potássio (4,06 g) foi preparada em 10 ml de água e gotejado lentamente na solução de cálcio sob agitação, controlando o pH na faixa acima de 10 para garantir a precipitação da fase HAP desejada. Após a síntese, a solução contendo a hidroxiapatita obtida foi seca em estufa. O pó sintetizado por co-precipitação foi submetido a tratamento térmico para obtenção de HAP cristalina.

5.2. FORMADORES DE POROS

Foram testadas três moléculas orgânicas polietileno glicol (PEG), álcool polivinílico (PVA) e carboximetilcelulose (CMC). Os testes com as moléculas para formação do poro foram realizados utilizando a mistura de moléculas durante a síntese da HAP (reação *in situ*) ou após a síntese da HAP (mistura *ex situ*).

5.2.1. Formadores de poros através de reação *in situ*

Para a síntese *in situ* de formação de poros foi adicionada 10% e 20 % da molécula orgânica durante a síntese da hidroxiapatita (5 gramas). A molécula formadora de poro foi adicionada a solução de hidróxido de cálcio antes do gotejamento de fosfato de potássio.

5.2.2. Formadores de poros através de reação *ex situ*

Para a síntese *ex situ* de formação de poros foi adicionada 10% e 20 % da molécula orgânica após a hidroxiapatita sintetizada (5 gramas). A molécula formadora de poro foi adicionada após a HAP ter sido levada para estufa. A molécula orgânica e a HAP foram misturados em um volume mínimo de água (5 mL) de maneira a gerar uma massa coesa. Após a secagem o material foi moído em cadinho.

A seguir o fluxograma simplificado do processo de síntese da HAP.

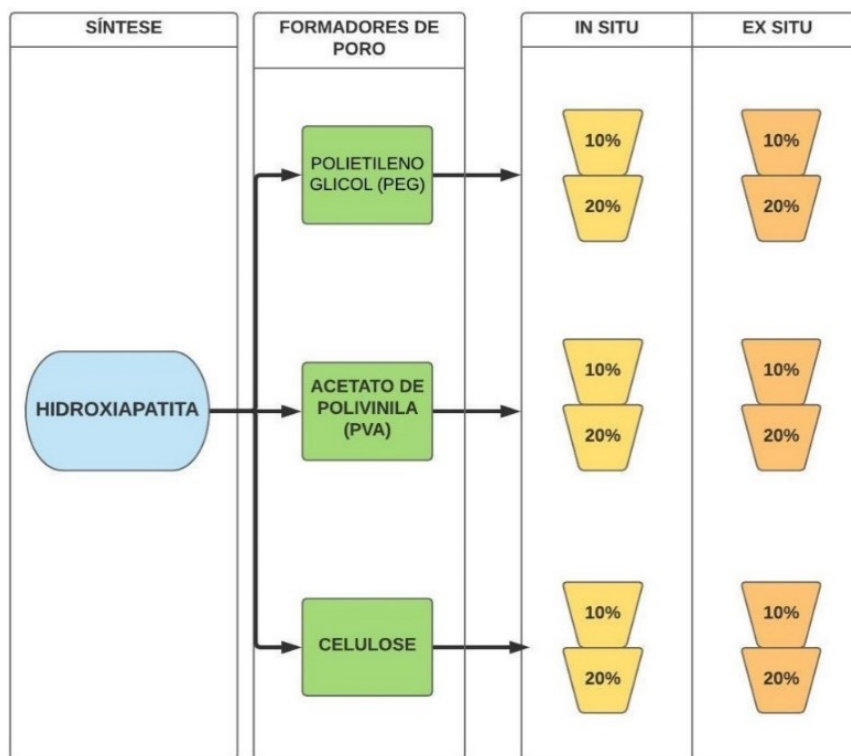


Figura 6 - Fluxograma de síntese da HAP
 FONTE: Autoria própria.

5.3. DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

As amostras de HAP a verde e sintetizadas foram enviadas para análise de difração de raios X. As análises foram feitas no difratômetro da marca Bruker modelo D2 Phaser 2nd Genmostrado, utilizando ânodo de cobre, com o parâmetro 2θ graus variando de 20° a 80° , velocidade de $0,03^\circ/s$ e fenda (*slit*) de $0,2$ mm.

5.4. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

Nesta análise foi utilizado amostras de HAP com 10% de formadores de poros (PEG, PVA e CMC). As amostras foram enviadas para termogravimetria (Analisador Termogravimétrico Shimadzu TGA-51H), e submetidas à aquecimento até 800°C , com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ e fluxo de gás de arraste de ar sintético de 20 ml/min.

5.5. SINTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.

As amostras de HAP com formadores de poros foram sinterizadas em um forno Nabertherm LHT 02/17 LB Speed. A rampa de sinterização adotada pode ser

vista na Figura 7. As amostras em temperatura ambiente (25 °C) foram submetidas a um aquecimento na taxa de 1 °C por minuto até 800 °C seguida de 5 °C por minuto até 1100 °C.

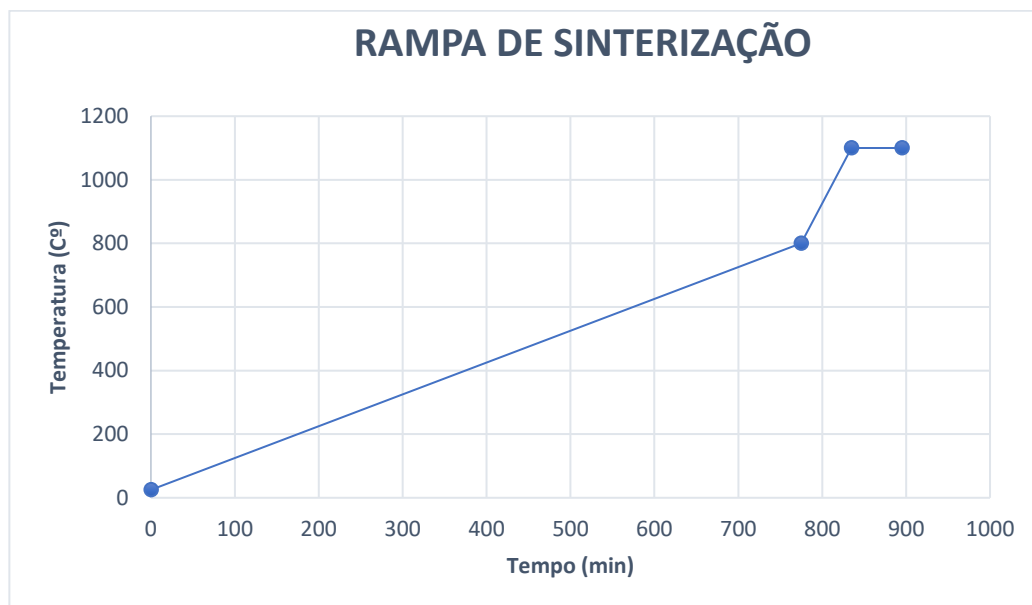


Figura 7 - Rampa de sinterização.
Fonte: Autoria própria.

5.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras de HAP após o processo de sinterização foram analisadas em aparelho de microscopia eletrônica de varredura (MEV) FEI Quanta 200 (Universidade Estadual de Londrina). Para possibilitar a visualização de tal superfície no microscópio, foi necessário a realização de *sputtering* com partículas de ouro sobre a superfície (Aparelho de *sputtering/coating* Bal-Tec SCD-050). As amostras foram analisadas utilizando com ampliações de 800x, 3000x, 60000x e 15000x.

5.7. GRANULOMETRIA DAS PARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA

Para a aplicação biológica das partículas da HAP é necessário que as mesmas tenham porosidade adequada e sejam regulares de forma a otimizar a atuação e multiplicação das células ósseas. Para homogeneizar o tamanho das partículas foi realizado um teste utilizando Spray Dryer, substituindo a secagem em estufa.

Amostras de HAP com formador de poro CMC (10%) foram preparadas e seca em *Spray Dryer*. Os parâmetros utilizados foram: temperatura de secagem 170 ° C, fluxo de ar 35 L/min, vazão 0,4 L/h e vazão do blower 1,95 m³/min. Testes foram realizados para monitorar o tamanho do pico de saída do spray. Para os testes foram utilizados picos de 1,0 mm e 1,2mm.

5.8. ENSAIOS DE POROSIMETRIA DE MERCÚRIO

A porosimetria de mercúrio foi realizada nas amostras utilizando um porosímetro (Micromeritics *Autopore IV*), que possui um penetrômetro modelo 24 para inserção do mercúrio nos poros. Dentre os parâmetros do penetrômetro utilizado, a constante de penetração utilizada foi de 33,130 µL/pF, o volume do tubo capilar (stem) foi de 3,6230 mL, o volume penetrado foi de 17,8462 mL, a massa penetrada foi de aproximadamente 75 g, e a pressão máxima utilizada foi 4,45 psi.

Já os parâmetros utilizados em relação ao mercúrio introduzido foram, durante o período de baixa pressão, a pressão de evacuação de 50 µmHg durante 5 minutos, com pressão de preenchimento de 0,52 psi, e tempo de equilíbrio de 300 segundos. Já durante o período com alta pressão, o tempo de equilíbrio foi também de 300 segundos.

5.9. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

5.9.1. Ensaio de citotoxicidade do AZ na presença de HAP.

Primeiramente o ácido zoledrônico foi diluído em NaOH 0,1 molar para ser misturado a Hidroxiapatita. Amostras de HAP com AZ foram preparadas onde se manteve a concentração de AZ 1,36 % sobre a massa de HAP (Tabela 1). As amostras foram liofilizadas e levadas para o ensaio de citotoxicidade.

Tabela 1 - Concentração de HAP e AZ utilizados para os testes de citotoxicidade.

Número da Amostra	Massa de HAP	Massa de AZ
Amostra 1 (Controle)	0	0
Amostra 2 (T2)	20 mg	0,0272 mg (0,0001 M)
Amostra 3 (T5)	100 mg	1,36 mg (0,0005 M)
Amostra 4 (T3)	200 mg	2,72 mg (0,001 M)
Amostra 5 (T4)	500 mg	6,8 mg (0,0025 M)
Amostra 6 (T1)	1000 mg	13,6mg (0,005 M)

Os testes de citotoxicidade foram realizados pelo professor doutor Mario Sérgio Mantovani do departamento de Biologia da Universidade Estadual de Londrina. O ensaio (resazurina) foi baseado em (O'Brien et al. 2000). Foi utilizada uma placa com 48 poços. Foram semeadas 6×10^4 células V79 em cada poço, com 0,2 mL de meio de cultivo completo (DMEM/F12). As células permaneceram em cultura por 24 horas para estabilização. Após este período, as células foram tratadas com as concentrações de 1-5 (T1-T5) (volume final 0,4 mL) por 24 h e 72 h, além dos controles positivos (MMS). Após o término do tratamento (24 h e 72 h), foi adicionado 50 μ L de meio com resazurina (concentração final 60 μ M) em cada poço. As células foram incubadas a 37°C por 4 horas. Após, a leitura foi realizada em espectrofotômetro GLOMAX, em fluorescência, excitação Green 520nm, emissão 580-640. A análise foi realizada em 3 repetições experimentais.

5.9.2. Ensaio de citotoxicidade com AZ.

O ácido zoledrônico foi diluído em NaOH 0,1 molar a uma concentração de 0,1 mola. Foram preparadas 7 amostras de diferentes concentrações e levadas para análise (Tabela 2). Ensaio de Citotoxicidade (resazurina) foi baseado em O'Brien et al. 2000. Foi utilizada uma placa com 48 poços. Foram semeadas 6×10^4 células V79 em cada poço, com 0,2 mL de meio de cultivo completo (DMEM/F12). As células permaneceram em cultura por 24 horas para estabilização. Após este período, as células foram tratadas com as concentrações de 1-6 (T1-T6)(volume final 0,4 mL) por 24 h, 48 h e 72 h, além dos Controles e Controles Positivos (MMS). Após o término do tratamento (24 h, 48 h e 72 h), foi adicionado 50 μ L de meio com resazurina (concentração final 60 μ M) em cada poço. As células foram incubadas a 37°C por 4

horas. Após, a leitura foi realizada em espectrofotômetro GLOMAX, em fluorescência, excitação Green 520nm, emissão 580-640. A análise foi realizada em 3 repetições experimentais.

Tabela 2 - Concentração de AZ utilizados para os testes de citotoxicidade.

Número da Amostra	Concentração (mM)
Amostra 1 (Controle)	0
Amostra 2	0,01
Amostra 3	0,05
Amostra 4	0,1
Amostra 5	0,5
Amostra 6	1
Amostra 7	5
Amostra 8 (controle positivo)	MMS

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A produção de enxertos ósseos a partir de HAP porosa são amplamente utilizados como biomaterial devido sua biocompatibilidade e bioatividade com o corpo vivo (JARDIM et al., 2009). Entretanto, é fundamental a caracterização do material de HAP sintetizado. Após o processo de síntese de HAP, o material foi seco em estufa, triturado em pistilo e levado para análise de DRX.

6.1. ANÁLISE DE DRX

Para verificar se a fase da Hidroxiapatita sintetizada era o composto que desejado foi realizado difração de Raio X (Figura 8). Na Figura 8 observa-se o DRX da amostra sinterizada (linhas em preto) e os picos referentes ao modelo teórico da HAP (linhas em verde). Picos semelhantes da HAP sintetizada comparada com a de referência, tanto em relação ao valor do ângulo dos picos quanto como em relação a intensidade, demonstra que o composto sintetizado é a fase de HAP.

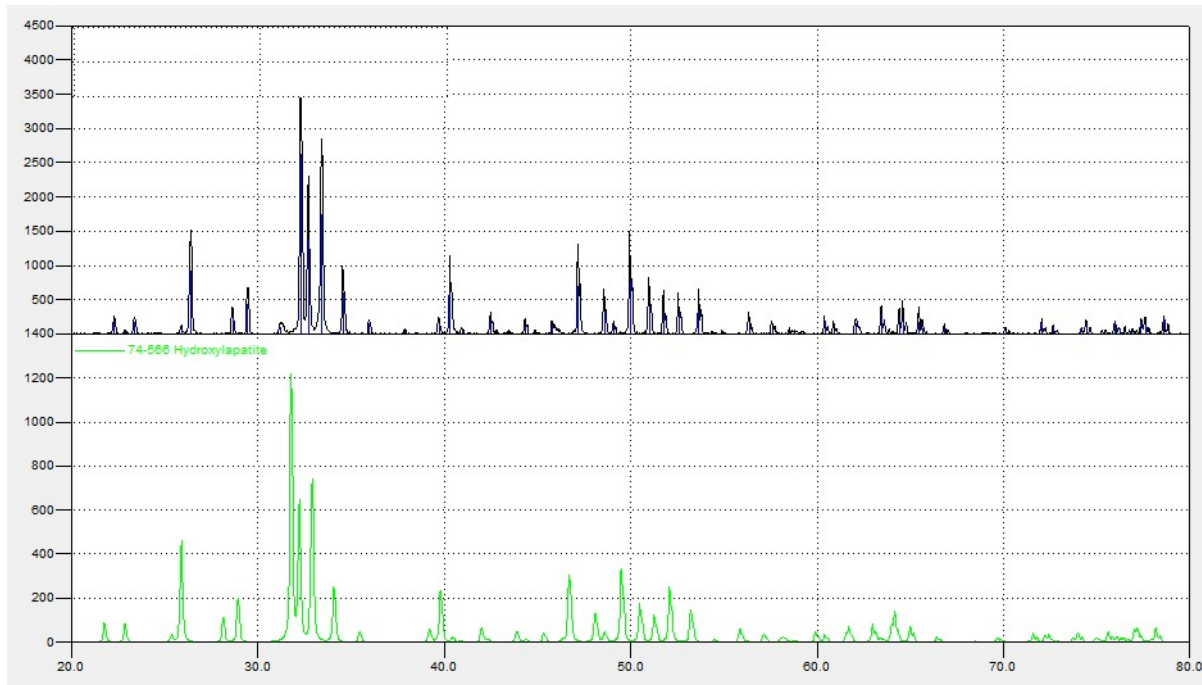


Figura 8 - DRX da amostra de hidroxiapatita
FONTE: Autoria Própria.

6.2. ANÁLISE DE TERMOGRAVIMETRIA

A análise termogravimétrica foi realizada com a finalidade de definir as temperaturas de degradação dos compostos orgânicos e ajustar uma curva de aquecimento e sinterização. Abaixo estão ilustrados os resultados obtidos.

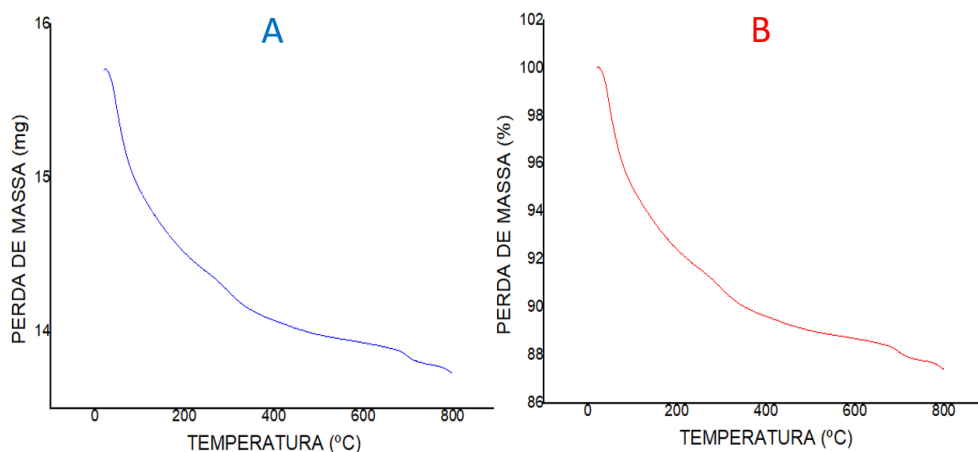


Figura 9 - Curva de TGA da amostra de HAP com 10 % de carboximetilcelulose. (A) - Temperatura versus massa em mg. (B) – Temperatura versus percentual de massa perdida.

FONTE: Autoria Própria.

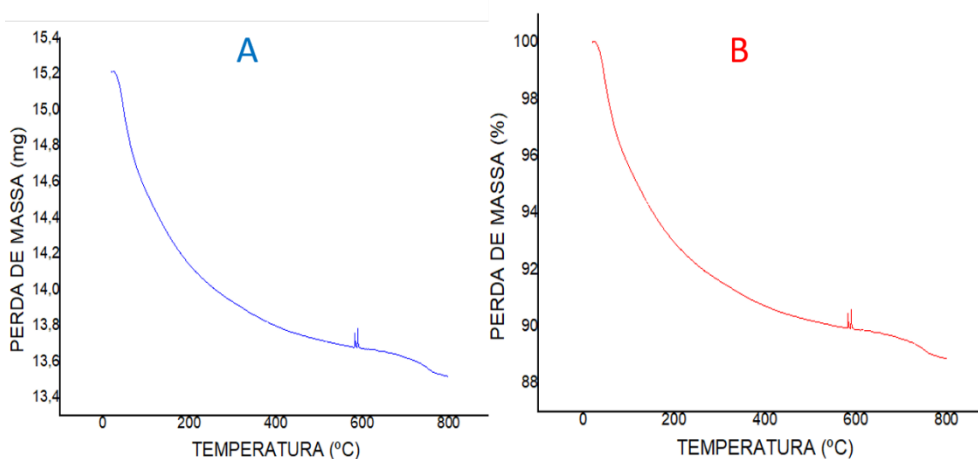


Figura 10 - Curva de TGA da amostra de HAP com 10 % de PEG. (A) - Temperatura versus massa em mg. (B) – Temperatura versus percentual de massa perdida.

FONTE: Autoria Própria.

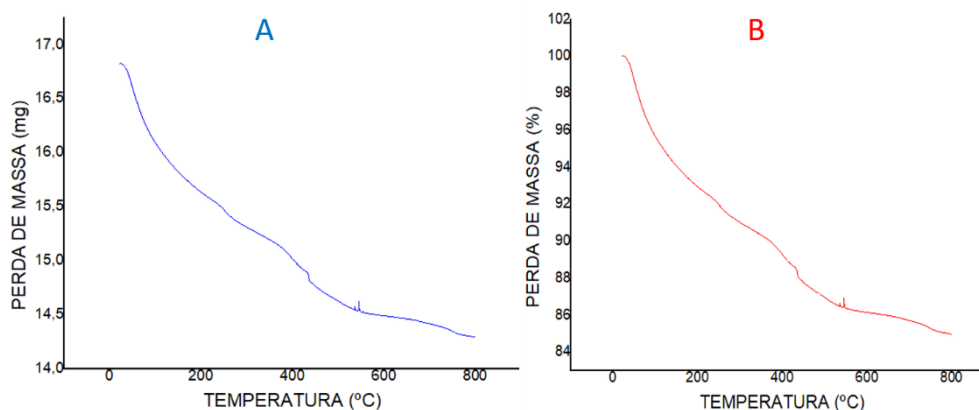


Figura 11 - Curva de TGA da amostra de HAP com 10 % de PVA. Temperatura versus percentual de massa perdida.
 FONTE: Autoria Própria.

Segundo (MACHADO, 2000), a carboximetilcelulose sofre uma perda inicial de aproximadamente 15% devido à perda de umidade residual e tem sua completa degradação a temperaturas acima de 500 °C. Na Figura 9 é possível verificar uma pequena mudança na inclinação da curva quando a temperatura se aproxima de 100 °C, nesta região 5% da massa já foi evaporada, o que representa a perda de água da amostra. Em seguida observa-se um decaimento contínuo da massa até aproximadamente 9 mg em massa representando a degradação da carboximetilcelulose que ao atingir a temperatura de 500°C foi completamente retirada da amostra com cerca de 10 % de massa retirada (0,5 g).

Em (DRUMOND et al. 2004) a degradação do PEG acontece em um único estágio, entre 370 °C e 430 °C com uma perda de massa de 98% e componentes residuais de 2%. A Figura 10 mostra o decaimento contínuo e abrupto da massa até aproximadamente 450 °C onde 10% da amostra já foi degradada, em seguida um segundo decaimento abrupto em torno de 700 °C finalizando a degradação do PEG.

Como mostrado por (FERNANDES, 2013) o PVA decompõe-se em duas etapas bem definidas, onde 70% é degradado a aproximadamente 360 °C e 21% degrada-se em torno de 470 °C, formando um resíduo de 9%. Na figura 11 o PVA acaba se comportando de maneira parecida à carboximetilcelulose quanto a regularidade de degradação, no entanto o PVA degrada-se mais rapidamente, o gráfico mostra leves alterações na inclinação como em 250 °C e 500 °C onde percebe-se a desaceleração da perda de massa. Ainda em torno de 500 °C a análise termogravimétrica mostrou irregularidades e ruídos na curva o que provavelmente significa a influência externa já mencionada no início desta análise.

Essa análise foi repetida 2 vezes e as curvas apresentaram o mesmo padrão. Acredita-se que o aparelho possa estar apresentando problemas para aquisição de uma curva perfeita.

6.3. ANÁLISE DAS IMAGENS DO MEV

O ensaio de microscopia eletrônica de varredura foi realizado com o intuito de observar a superfície do material e os poros formados pelo vazio dos orgânicos formadores de poro.

6.3.1. Análise do método de Síntese *Ex Situ* e *In Situ*

A primeira análise com MEV teve como objetivo verificar qual método *Ex Situ* ou *In Situ* apresentaria melhor formação de poros. A Figura 12 mostra as imagens de MEV de amostras contendo HAP e 10 % de PEG utilizado como formador de poros.

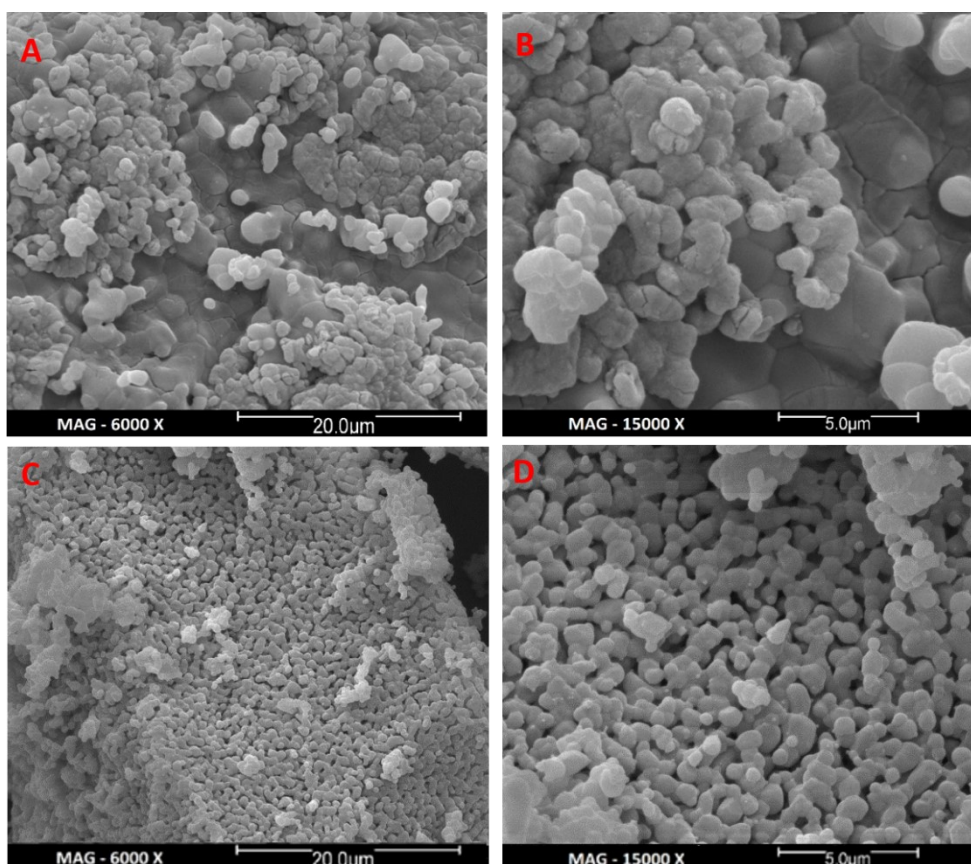


Figura 12 - Imagens de MEV da Hidroxiapatita + PEG (10 % da massa de HAP) após a sinterização. (A e B) - *In Situ*. (C e D) - *Ex Situ*.
FONTE: Autoria Própria.

Na análise das Figura 12 é possível observar que existe uma diferença entre as estruturas formadas. As amostras *ex situ* formaram compostos mais agrupados com pouca formação de possíveis poros, enquanto as amostras *in situ* formaram estruturas com mais espaços o que indicaria uma boa formação de porosidade, os vazios são mais simétricos e de formatos mais arredondados. Assim, o método escolhido para a síntese foi o *in situ*.

6.3.2. Avaliação da Melhor Molécula Orgânica para Formação de Poro

Neste trabalho foram avaliadas as estruturas formadas a partir de diferentes formadores de poros. Como definido anteriormente e agora exemplificado através das imagens do MEV, a HAP pura e cristalina, Figura 13 (A e B) não apresenta porosidade adequada ao crescimento ósseo apesar de possuir estrutura química muito semelhante a encontrada na parte mineral do tecido.

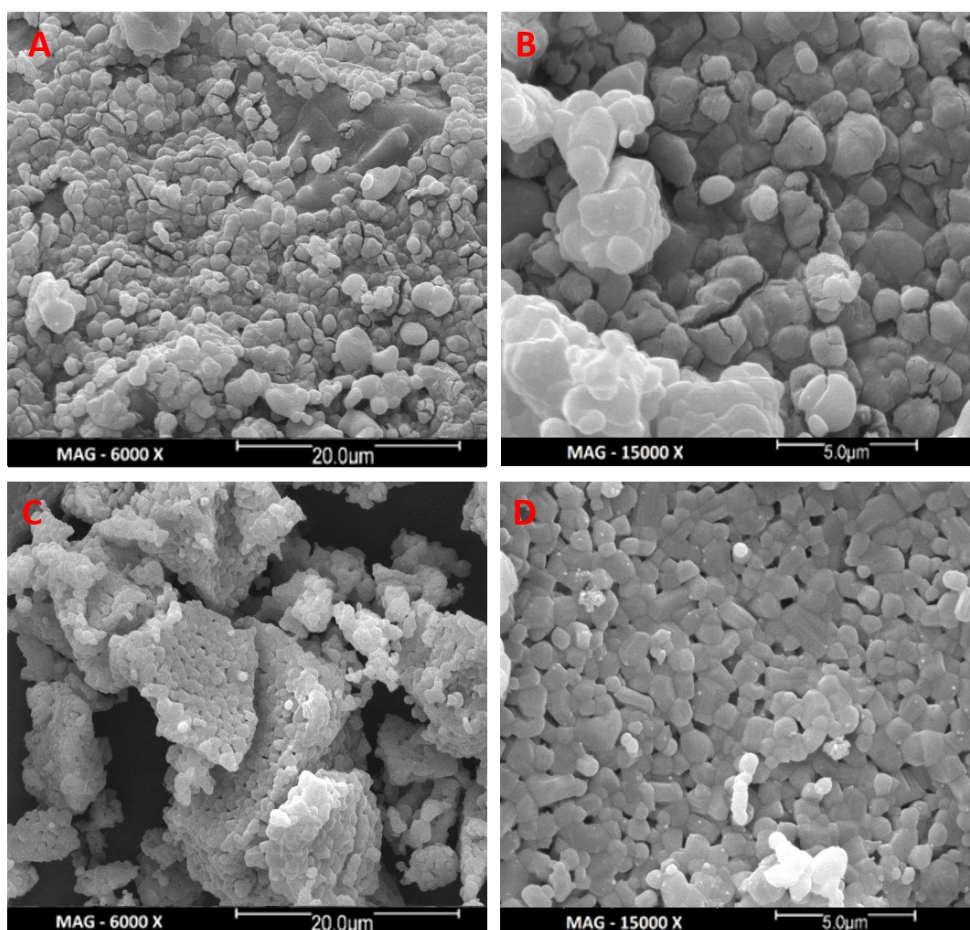


Figura 13 - Imagens do MEV de HAP sintetizada e HAP onde foram utilizados 10 % dos formadores de poros. Amostra A e B - HAP pura. Amostra C e D - HAP + 10% de Carboximetilcelulose. FONTE: Autoria Própria.

Comparando as imagens obtidas vemos que a HAP com os formadores de poros inseridos *in situ* alteram a estrutura em termos de porosidade, mas matem um padrão geral. Os três componentes utilizados formaram poros na HAP de aspecto arredado e superfície de aparência esponjosa. Nessas condições, os três teriam formado um material para enxerto adequado ao crescimento de células, mas é possível observar na Figura 13 (C e D), utilizando a molécula orgânica carboximetilcelulose, houve a formação de poros pequenos e irregulares, além disso a estrutura mostrou-se quebradiça.

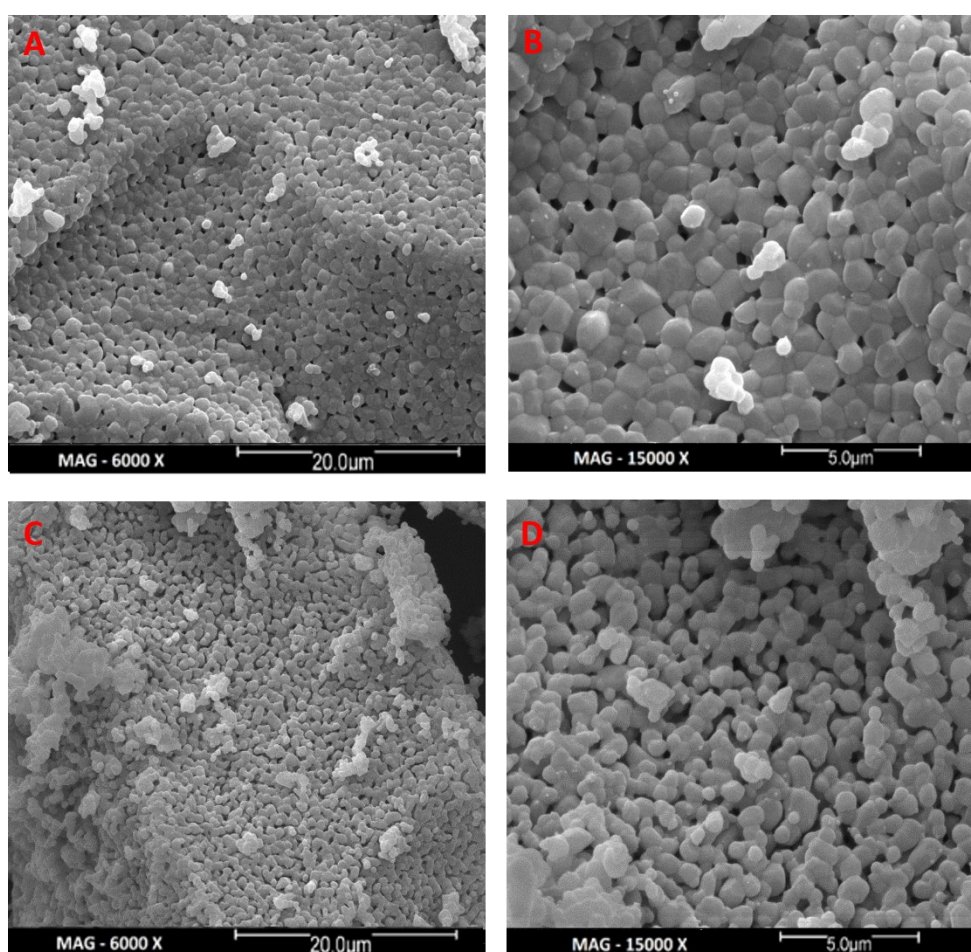


Figura 14 - Imagens do MEV de HAP sinterizada e HAP onde foram utilizados 10 % dos formadores de poros. Amostra A e B - HAP + 10% de PVA. Amostra C e D - HAP + 10% de PEG.
FONTE: Autoria Própria.

Já na Figura 14 (A e B) onde foi utilizado o PVA, o número e tamanho dos poros diminuiu apesar da estrutura mostrar-se mais concisa. Nas imagens C e D da Figura 14, HAP com 10% de PEG como formador de poros, observa-se uma estrutura mais concisa e regular, a superfície possui aspecto esponjoso de maior eficiência

justamente pelo aumento de tamanho e número de poros formados. Por esses critérios de análises selecionamos o PEG 1500 como o melhor composto formador de poros dentre os três experimentados.

6.4. POROSIMETRIA DE MERCÚRIO

Para os teste de porosimetria foi enviado 2 amostras de hidroxiapatita sintetizada em laboratório. A primeira foi sintetizada atarvés do metodo de precipitação, seca e sinterizada, logo, não foi utilizado nenhum metodo de formação de poros. Ja a segunda amostra foi sintetizada e durante a sintetização foi adicionado o PEG 1500 em 20% da massa de HAP e depois sinterizada.

Porosimetria de Mercúrio caracteriza a porosidade de um material através da aplicação de pressões em uma amostra imersa em mercúrio. A pressão necessária para introduzir mercúrio dentro da amostra é inversamente proporcional ao tamanho dos poros. Isto é chamado mais frequentemente de intrusão de mercúrio. A seguir temos os dados obtidos do teste de porosimetria da amostra 1 (Tabela 3). A coluna A indica a porcentagem de intrusão de mercúrio que penetrou a amostra em uma dada pressão (coluna B) e a coluna C indica o diametro do poro encontrado.

Tabela 3 - Dados da porosimetria - Amostra 1

A – Porcentagem de Intrusão de Mercúrio	B – Pressão (psi)	C - Diâmetro do Poro (µm)
6,95893E-28	0,5164482	350,20655
1,431122065	0,99681747	181,4409875
6,345541477	1,989617467	90,903675
13,60916042	3,977659464	45,46984063
25,19314766	7,968553066	22,6971625
70,28699493	15,9668045	11,32747266
85,13825989	29,95793533	6,03725
90,62685394	58,67360306	3,082536719
94,48661041	99,04639435	1,826048633
95,91729736	128,727417	1,405011816
97,05476379	168,6022644	1,072723047
97,84721375	217,5413818	0,83139834
98,58096313	283,4552917	0,638067236
99,0451889	369,7361145	0,489169238
99,30886841	480,4827576	0,376420459

99,6051712	626,1773682	0,288837549
99,77289581	813,6887817	0,222276074
99,93975067	1057,674316	0,17100116
99,93975067	1375,319336	0,13150658
99,95787811	1790,067993	0,101037244
99,95787811	2328,835938	0,077662634
100	3026,171631	0,059766449

Apartir dos dados da Tabela 3 foi gerado o gráfico de intrusão de mercúrio por diâmetro do poro e assim avaliar os poros formados (Figura 15).

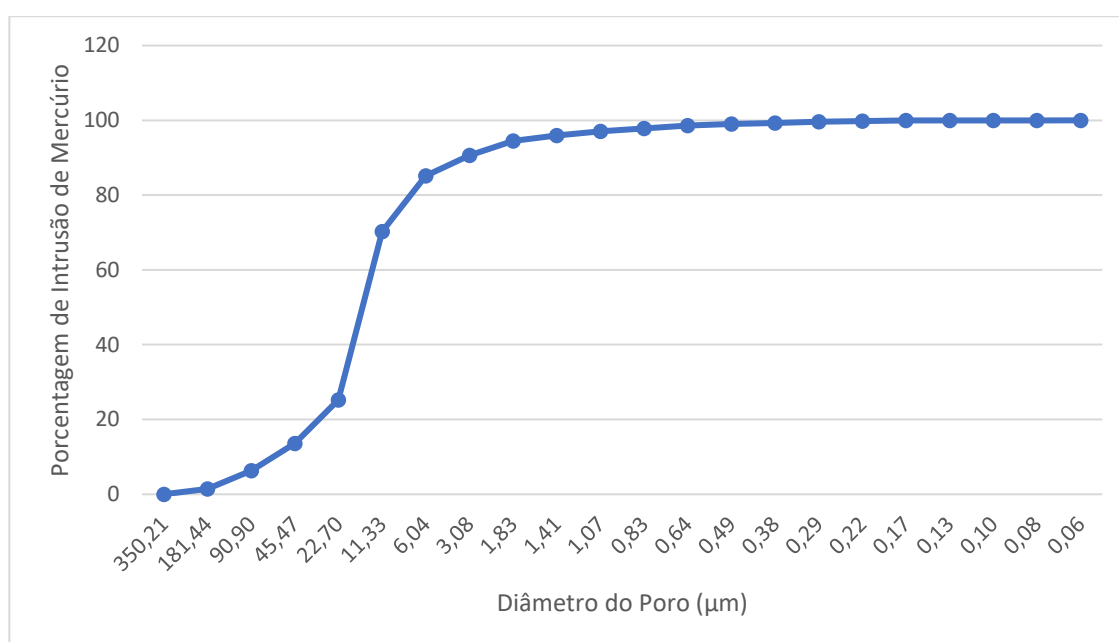


Figura 15 - Gráfico de porosidade - Amostra 1. Intrusão de mercúrio por diâmetro do poro.
 FONTE: Autoria Própria

Tabela 4 - Dados de porosimetria - Amostra 2.

A – Porcentagem de Intrusão de Mercúrio	B – Pressão (psi)	C - Diâmetro do Poro (μm)
5,46468E-28	0,517276645	349,645675
2,311265945	0,99502331	181,76815
10,15684795	1,98154211	91,27413125
17,04823685	3,981510639	45,42585938
26,12366867	7,985936165	22,64775625
68,15054321	15,97486496	11,32175703
84,01134491	29,96472168	6,035882422
90,11631775	58,8561554	3,072975781
94,02238464	98,92805481	1,828233008

95,45844269	128,0688171	1,412237109
96,62919617	168,0617065	1,076173438
97,51060486	217,1236572	0,832997852
98,1887207	283,6174622	0,637702393
98,72858429	368,9377441	0,490227783
99,14309692	479,5653076	0,377140576
99,54397583	627,4784546	0,288238647
99,72737122	813,3717041	0,22236272
99,8596344	1058,449097	0,170875989
99,94881439	1375,638184	0,131476099
100	1789,935425	0,101044727

Apartir dos dados da Tabela 4 foi gerado o grafico de intrusão de mercúrio por diametro do poro e assim avaliar os poros formados (Figura 16).

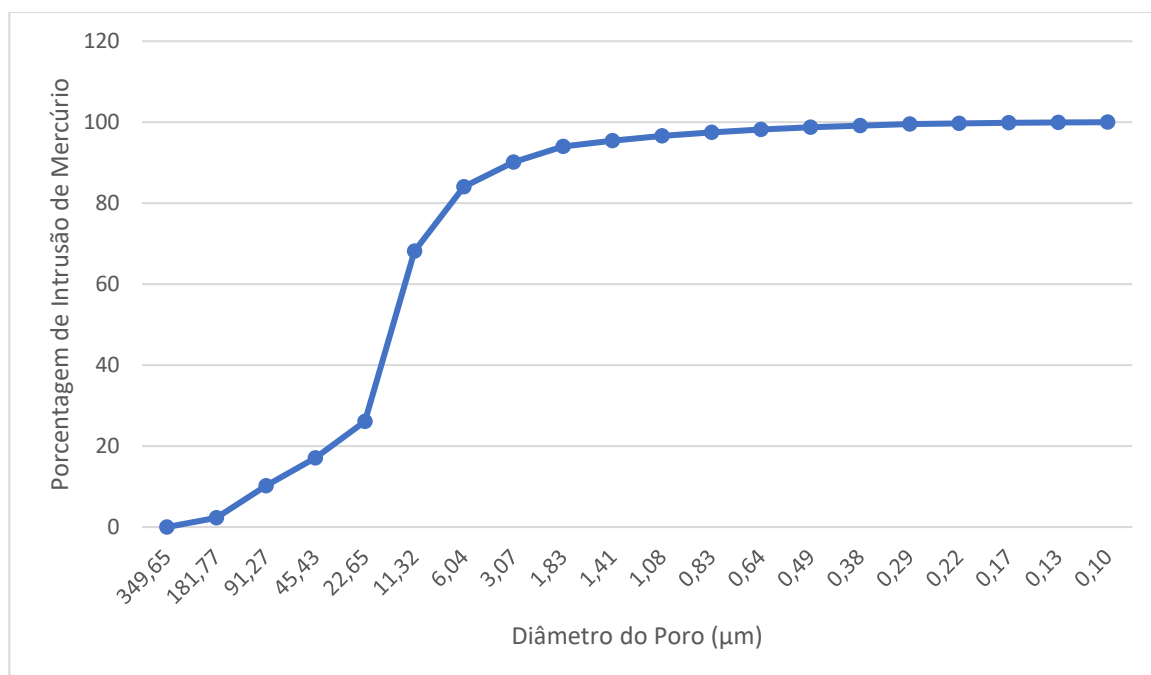


Figura 16 - Gráfico de porosidade - Amostra 2. Intrusão de mercúrio por diâmetro do poro.
FONTE: Autoria Própria.

Para ambas as amostras os resultados foram muito parecidos, cerca de de 90% do volume de mercurio havia penetrado completamente as amostras a uma pressão relativamente baixa, indicando que a penetração ocorreu nos vazios intersticiais. A porcentagem de intrusão de mercúrio a partir de 97,05 mL/g com tamanho de poros 1,07 μm (Tabela 3), indica que somente a formação de 3 % de formação de poros interligados. Observem que a pressão de mercúrio utilizada foi de 168.5 psi. Esse alto de valor de pressão indica que se trata de um poro interligado. Para a

amostra 1 temos 96,6 mL/g de intrusão de mercúrio com 168,06 psi de pressão (Tabela 4), o que indica que a formação de poros interligados ficou na casa de 3 ou 4 %.

Os resultados da porosimetria mostram que o método utilizado, neste caso, não formou poros em nenhuma das amostras.. Os teste mostram que os vazios vistos nas imagens do MEV são espaços intersticiais e logo não possuem internectividade como esperado na formação de poros.

6.4.1. Avaliação da Morfologia do Grão da HAP

Para homogeneizar o tamanho dos grãos formados foi utilizado a secagem por spray drying. A técnica de spray drying é utilizada para a secagem de matérias com vantagens de escalabilidade e o usuário pode ajustar várias propriedades das partículas, como distribuição de tamanho e dispersibilidade. Assim, a HAP após ser sintetizada por co-precipitação e misturada com orgânico foi seca utilizando a técnica de spray drying utilizando bicos de saída de 1 mm e 1,2 mm.

O material seco foi levado para análise das imagens do equipamento MEV (Figura 15). A Figura 17 (A, B) utilizou bico de 1,0 mm e a Figura 17 (C e D) utilizou bico de 1,2 mm. Em ambas as figuras pode se notar um arredondamento do material e também um aumento das dimensões dos grãos quando comparados com a secagem em estufa.

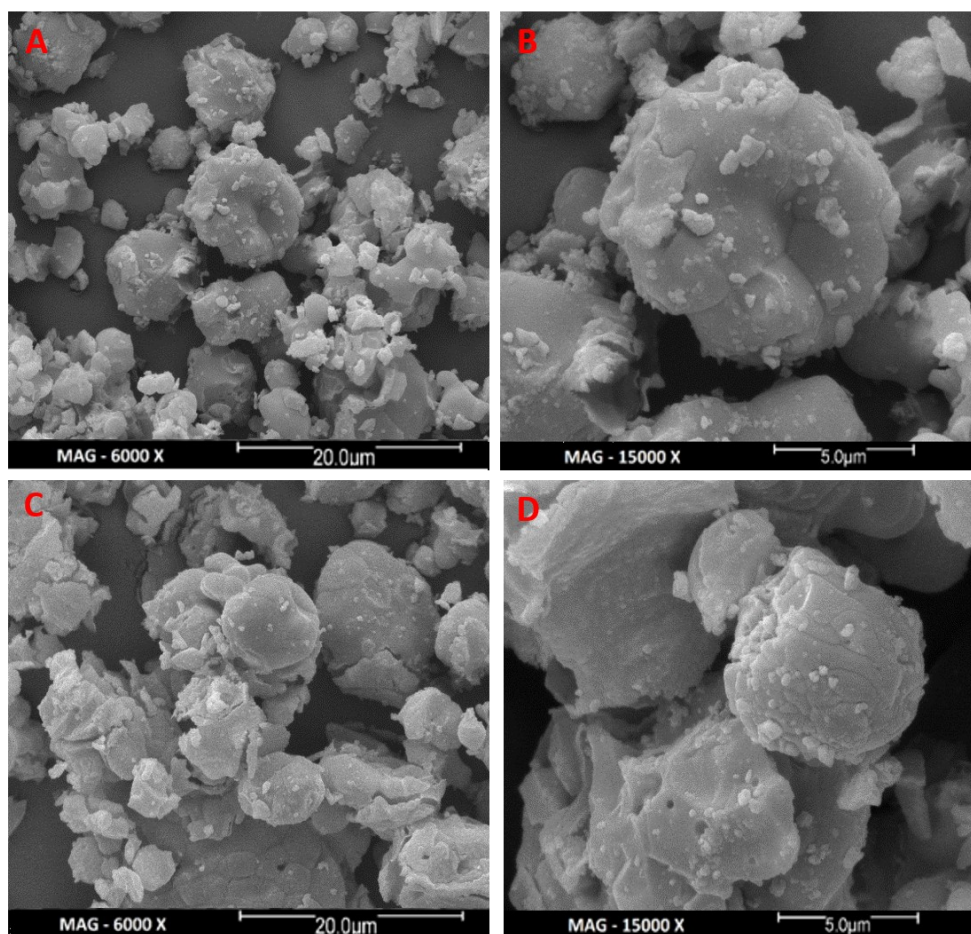


Figura 17 - Imagens do MEV. Amostras de HAP após secagem por Spray Drying, (A e B) bico de 1,0 mm de diâmetro e (C e D) bico de 1,2 mm de diâmetro.

FONTE: Autoria Própria.

6.5. TOXICIDADE DE ÁCIDO ZOLEDRONICO EM HIDROXIAPATITA

A seguir a tabela referente a nomenclatura das amostras de hidroxiapatita e ácido zoledrônico.

Tabela 5 - Nomenclatura de dados de citotoxicidade (HAP + ZOD).

Número da Amostra	Massa de HAP (g)	Concentração de AZ
Amostra (Controle)	0	0
Amostra T2	0,02	0,1 mL de AZ (0,0001 M)
Amostra T5	0,1	0,5 mL de AZ (0,0005 M)
Amostra T3	0,2	1 mL de AZ (0,001 M)
Amostra T4	0,5	2,5 mL de AZ (0,0025 M)
Amostra T1	1	5 mL de AZ (0,005 M)

Controle positivo (MMS)	2 mM de metil metanosulfonato (MMS)	
-------------------------	-------------------------------------	--

A tabela abaixo mostra a distribuição das amostras na placa de poços.

Tabela 6 - Quadro de disposição das amostras de HAP+AZ e controle positivo (MMS).

Controle	MMS	T1	T2	T3	T4	T5	Controle
Controle	MMS	T1	T2	T3	T4	T5	Controle
Controle	MMS	T1	T2	T3	T4	T5	Controle
Controle	MMS	T1	T2	T3	T4	T5	Controle
Controle	MMS	T1	T2	T3	T4	T5	Controle
Controle	MMS	T1	T2	T3	T4	T5	Controle

Em seguida, a Figura 18 mostra as diferentes etapas do processo de análise citotóxica. Na Figura tem-se a fase de prepara do teste de citotoxicidade com 48 poços contendo células V79 antes do tratamento (60% de confluência). A Figura 18 B mostra os poços imediatamente após adição da HAP/AZ, exibindo uma coloração rosa claro. Na Figura 18 C, foi adicionado resazurina e a Figura 18 D analise depois de 48 h. Após 24h de tratamento os poços apresentavam coloração indicando uma baixa toxicidade para todas as amostras (vermelho) e isso pode ser confirmado depois de 72 h de tratamento (Figura 18 F). Para confirmar esse resultado os poços foram levados para análise de fluorescência.

Cores semelhantes significam resultados semelhantes. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

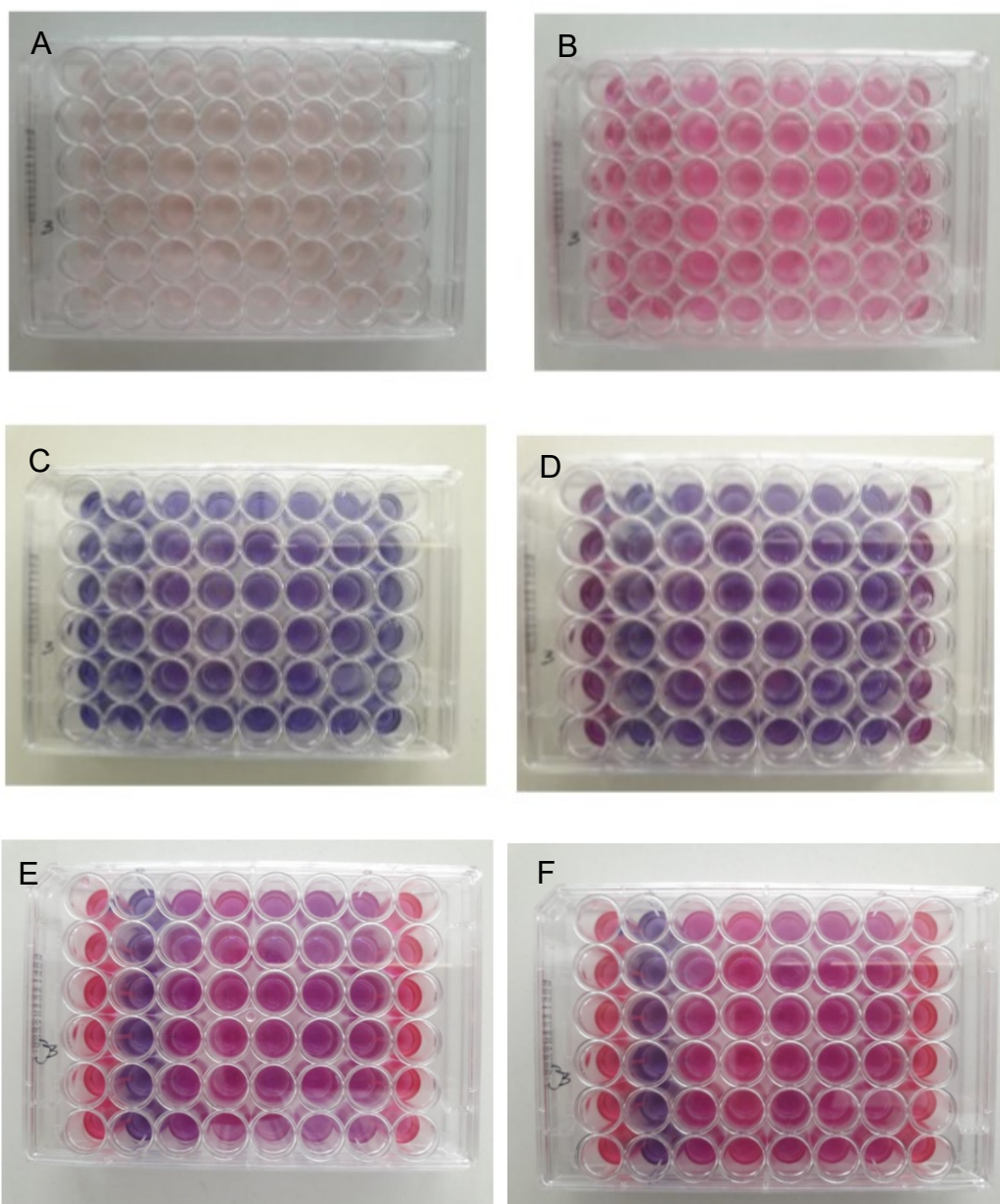


Figura 18 - A) Placa de 48 poços com células V79 antes do tratamento de HAP/AZ (60% de confluência). B) Placas de 48 poços imediatamente após o tratamento com HAP/AZ. C) Placa de 48 poços após a adição de resazurina. D) Placa de 48 poços após 4h de adição da resazurina. E) Placa de 48 poços 24h após a adição de resazurida. F) Placa de 48 poços 72h após a adição de resazurida.

FONTE: Autoria Própria.

A seguir temos as imagens de microscópio das amostras ao final dos tratamentos por 24 horas após lavagem com PBS.

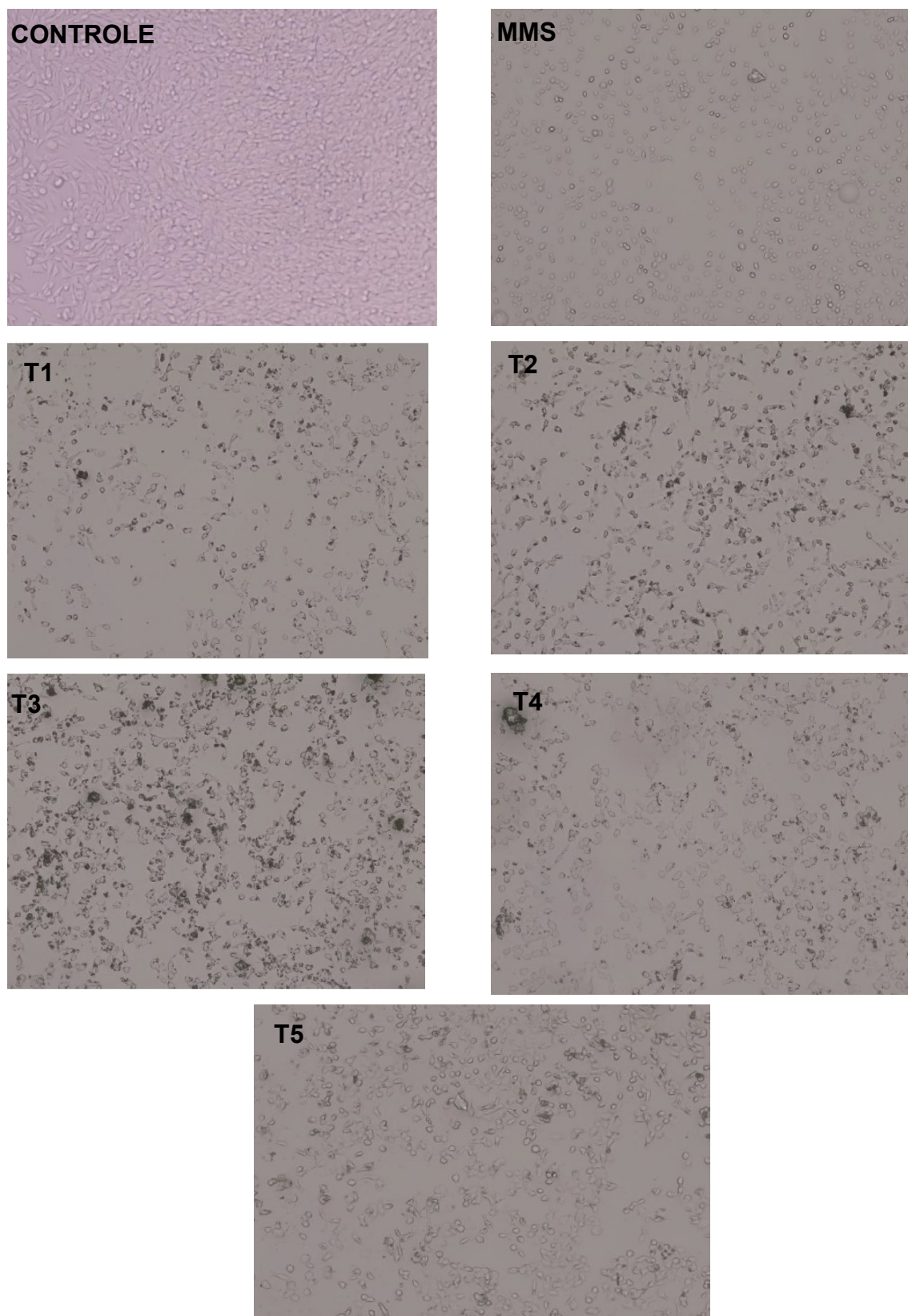


Figura 19 - Imagens de microscópio dos poços das amostras de HAP/AZ.
FONTE: Autoria própria.

A partir das imagens de microscópio (Figura 19) é possível observar a dificuldade da proliferação celular nas amostras T1-T5 já que, a contagem de células é visualmente muito menor comparada ao controle. Além disso, na imagem controle e em MMS observa-se a regularidade na forma das células enquanto nas amostras contendo HAP/AZ vemos uma deformidade em formato e tamanho, isso pode ser explicado em função da formação de um depósito de HAP no fundo do poço, dificultando o crescimento celular.

Essa diminuição do número de células fica comprovada através da contagem celular realizada em triplicada nos poços. A Tabela 7 mostra os resultados de contagem de células do controle, MMS seguido das diferentes concentrações (vide tabela 6, sem a última coluna que é controle). Pode se perceber que em todas as amostras houve um decaimento considerável na contagem de células o que indica a citotoxicidade das amostras apresentadas.

Tabela 7 - Tabela de valores médios de células encontrados nas amostras.

	Controle	MMS	1	2	3	4	5
EXP 1	3,59E+04	5,17E+03	7,90E+03	1,32E+04	6,30E+03	7,16E+03	5,93E+03
EXP 2	3,91E+04	5,58E+03	8,38E+03	7,54E+03	6,16E+03	7,68E+03	6,99E+03
EXP 3	3,84E+04	5,48E+03	8,34E+03	7,04E+03	6,29E+03	7,96E+03	7,14E+03

Todas as concentrações apresentaram toxicidade, isso pode ser explicado em função do preparo do teste. O pó de HAP sedimentou sobre as células nos poços, isso pode ter sido a razão pela morte das células. Nova metodologia para avaliar a citotoxicidade deve ser realizada.

Para verificar qual a melhor concentração de ácido zoledrônico foi realizado teste de citotoxicidade somente utilizando o fármaco.

6.6. TOXICIDADE DO ÁCIDO ZOLEDRONICO

Foi realizado também testes de citotoxicidade com amostras de apenas ácido zoledrônico, os testes foram também realizados em triplicata.

Os testes foram realizados com as seguintes concentrações de AZ: 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 mM e dispostos nos poços como demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Quadro de disposição das amostras de AZ e controle positivo (MMS).

Controle	T1	T2	T3	T4	T5	T6	MMS
Controle	T1	T2	T3	T4	T5	T6	MMS
Controle	T1	T2	T3	T4	T5	T6	MMS
Controle	T1	T2	T3	T4	T5	T6	MMS
Controle	T1	T2	T3	T4	T5	T6	MMS
Controle	T1	T2	T3	T4	T5	T6	MMS

A Figura 20 mostra as imagens das placas com 48 poços durante o processo de tratamento do teste. Figura 20 A imediatamente após o tratamento das células com AZ. Figura 21 B após 24 h de tratamento com AZ. Figura 20 C, foi adicionado resazurina e a Figura 20 D após 4 horas de adição de resazurina.

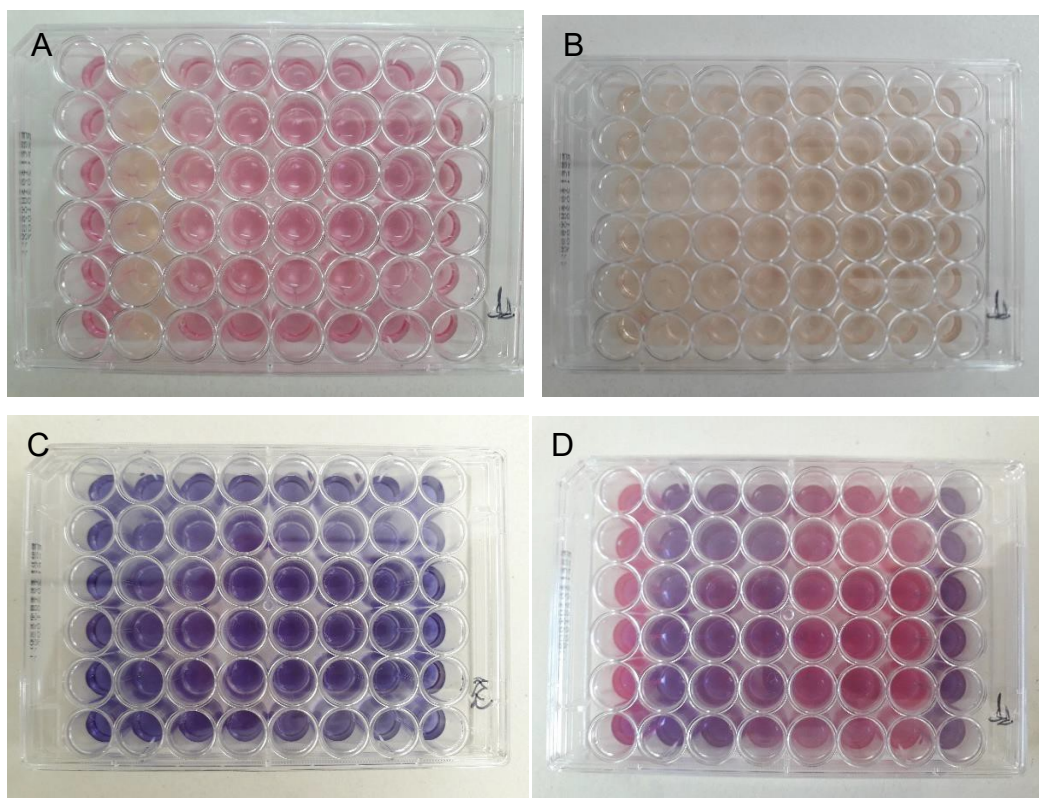


Figura 20 - A) Placa de 48 poços com células V79 imediatamente após o tratamento com AZ. B) Placa de 48 poços após 24 h de tratamento com AZ. C) Adição de resazurina nos poços. D) Placa de 48 poços após 4h de adição da resazurina.

FONTE: A autoria Própria.

A Figura 21 mostra o resultado dos 48 poços com o tratamento de 24, 48 e 72 horas.

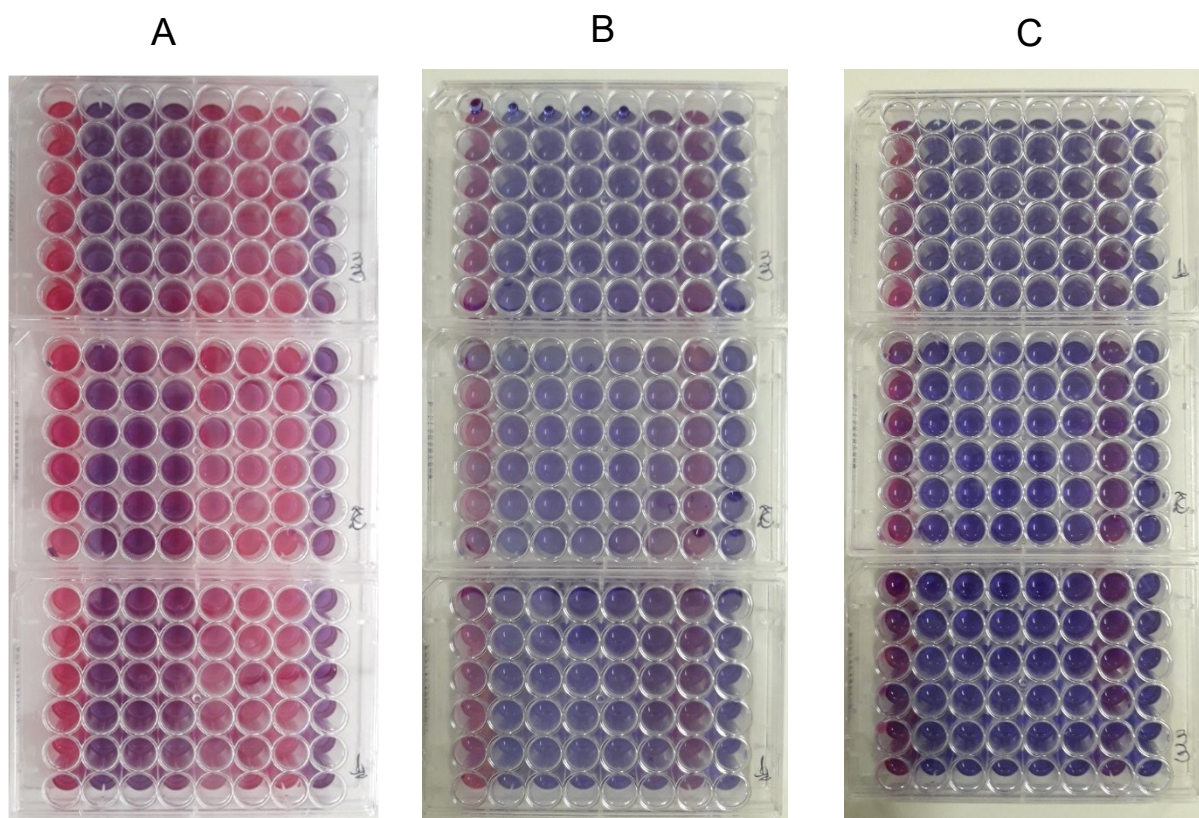


Figura 21 - Amostras do teste de citotoxicidade de AZ colocados em resazurina por A) 24h, B) 48 h e C) 72 h.

FONTE: Autoria Própria.

As colunas de poços representam cada uma das concentrações de ácido zoledrônico onde a primeira é o controle (concentração de AZ é 0) em coloração vermelho escuro. A partir daí temos as concentrações de AZ em ordem decrescente (5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 mM) de concentração e o último controle positivo. Quanto mais vermelho mais próximo ao controle. Quanto mais azul, mais citotóxico.

É possível observar que a cor azulada indica a maior citotoxicidade às células e que a penúltima coluna – menor concentração de ácido (0,01 mM) – mostra uma cor mais próxima ao controle, logo, verificamos que ainda há uma citotoxicidade, no entanto, muito mais baixa do que as outras. Isso pode indicar uma concentração mais próxima do ideal para utilização no corpo humano.

Essa diminuição do número de células fica comprovada através da contagem celular realizada em triplicada nos poços. A Tabela 9 mostra os resultados de contagem de células do controle, das diferentes concentrações (vide Tabela 8) e por

último o controle positivo (MMA). Pode se perceber que a toxicidade foi bastante pronunciada para as amostras 1-5. Entretanto, temos uma citotoxicidade menos acentuada para a amostra 6 (0,01 mM). Esse poderia ser o valor a ser utilizado ou uma diminuição desde pela metade poderia fornecer um valor adequado.

Tabela 9 - Tabela de valores médios de células encontrados nas amostras depois de 72 h.

	Controle	1	2	3	4	5	mms
EXP 1	3,59E+04	5,17E+03	7,90E+03	1,32E+04	6,30E+03	7,16E+03	5,93E+03
EXP 2	3,91E+04	5,58E+03	8,38E+03	7,54E+03	6,16E+03	7,68E+03	6,99E+03
EXP 3	3,84E+04	5,48E+03	8,34E+03	7,04E+03	6,29E+03	7,96E+03	7,14E+03

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foi sintetizado o composto a base de fosfato de cálcio conhecido como hidroxiapatita para aplicação de enxertia óssea. O material foi escolhido por sua semelhança estrutural ao tecido diferenciado e pela larga utilização do mesmo neste tipo de tratamento.

Apesar do composto citado possuir características semelhantes ao material ósseo, este, quando sintetizado e em sua fase cristalina não apresenta características porosas o suficiente para o crescimento celular, logo, foram inseridos 3 compostos orgânicos (CMC, PEG1500, PVA) nas proporções 10% e 20% ao composto para que quando fosse sinterizado os mesmos seriam expulsos do material e formariam os poros desejados.

Os resultados obtidos através da caracterização por difração de raios x indicaram a completa formação do composto requerido e de correta composição estrutural.

Foram realizadas análises termogravimétricas para caracterização das curvas de perda de massa e identificação do ponto de sinterização. Os testes, apesar de mostrarem a perda de massa do material orgânico de acordo com o esperado, no foi observado uma curva característica de um teste termogravimétrico onde é possível identificar os patamares de decaimento de massa ao decorrer do aumento de temperatura.

A caracterização por microscopia eletrônica de varredura indicou que o melhor método utilizado para o preparo da síntese da HAP com os formadores de poros é o método *in situ*. Concluiu-se também que o composto polietileno glicol (PEG 1500) forma supostos poros mais simétricos e visíveis e por isso foi escolhido como molécula orgânica para a formação do poro. Para o teste de spray drying optou-se por utilizar o bico de 1,2 mm de tamanho por gerar grãos maiores.

Em seguida foi realizado o teste de porosidade de mercúrio para confirmar os resultados de MEV. Os testes de porosidade de mercúrio mostraram que o material não apresentou poros interligados, mas sim, em sua maioria, vazios intergranulares e em menor número poros de 3 μ m de diâmetro ou menores.

Os testes de citotoxicidade foram citotóxicos tanto para o complexo HAP/AZ quanto para o AZ. Os testes mostraram que as amostras com os dois compostos juntos foram citotóxicas em todos os casos, acreditamos que talvez o método utilizado

não foi o mais adequado pois o material depositou-se sobre as células criando uma barreira física impedindo seu desenvolvimento.

Para o AZ constatamos que a faixa de concentração utilizada foi citotóxica também em todos os casos o que nos remete a reavaliar tanto o método quanto a concentração do mesmo. O zoledrônico é um dos principais ativos do tratamento de osteoporose e câncer ósseo, mas altamente toxicidade em determinadas concentrações e quantidades.

REFERÊNCIAS

ASHRAF, A. A.; ZEBARJAD, S. M.; HADIANFARD, M. J. The cross-linked polyvinyl alcohol/hydroxyapatite nanocomposite foam. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 3, p. 3149–3157, 2019.

CAI, Y. et al. Development of zoledronic acid functionalized hydroxyapatite loaded polymeric nanoparticles for the treatment of osteoporosis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 16, n. 2, p. 704–710, 2018.

CANULLO, L.; DELLAVIA, C. Sinus lift using a nanocrystalline hydroxyapatite silica gel in severely resorbed maxillae: Histological preliminary study. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 11, n. SUPPL. 1, p. 1–7, 2009.

DE ENGENHARIA, E.; FERNANDES, J. M. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul Síntese E Caracterização De Cimento De β -Fosfato Tricálcico Reforçado Com Hidrogel De Alginato De Sódio E Pva Para Aplicação Médico-Odontológica. 2013.

DE SOUZA, G. et al. Hidroxiapatita Como Biomaterial Utilizado Em Enxerto Ósseo Na Implantodontia: Uma Reflexão Hydroxyapatite As a Biomaterial Used in Bone Graft in Implantology: a Reflection. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 37, n. 3, p. 33–39, 2016.

DOGGRELL, S. A. Clinical efficacy and safety of zoledronic acid in osteoporosis and Paget's bone disease. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**, v. 4, n. 5, p. 405–415, 2009.

DOROZHKIN, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1465–1485, 2010.

DRUMOND, W. S.; WANG, S. H.; MOTHÉ, C. G. Síntese e caracterização do copolímero poli (ácido láctico-b-glicol etilênico). **Polímeros**, v. 14, n. 2, p. 74–79, 2004.

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

FONSECA, F. M. et al. Fabricação de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita por gelcasting. **Cit**, v. XXVIII, p. 33–41, 2011.

FOOK, M. V. L. et al. Porous Hydroxyapatite Scaffolds by Polymer Sponge Method. **Key Engineering Materials**, v. 396–398, p. 703–706, 2009.

FU, L. H. et al. Sonochemical synthesis of cellulose/hydroxyapatite nanocomposites and their application in protein adsorption. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

FU, S. Z. et al. Preparation and properties of nano-hydroxyapatite/PCL-PEG-

PCL composite membranes for tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 97 B, n. 1, p. 74–83, 2011.

GUICCIARDI, S. et al. Rheological characteristics of slurry controlling the microstructure and the compressive strength behavior of biomimetic hydroxyapatite. **Journal of Materials Research**, v. 16, n. 1, p. 163–170, 2001.

GUTIERRES, M. et al. Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, v. 19, n. 4, p. 153–162, 2005.

HABIB, F. et al. Development and Characterization of Porous Hydroxyapatite Scaffold by Using Polymeric Sponge Method. v. 4531, p. 1–7, [s.d.].

HSIEH, W. C.; LIAU, J. J. Cell culture and characterization of cross-linked poly(vinyl alcohol)-g-starch 3D scaffold for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 574–580, 2013.

JARDIM, C. G. et al. Enxerto Ósseo Em Odontologia Bone Graft in Odontology. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 30, n. 2, p. 24–28, 2009.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Development, in vitro and in vivo characterization of zoledronic acid functionalized hydroxyapatite nanoparticle based formulation for treatment of osteoporosis in animal model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, p. 173–183, 2015.

KIM, Y. W. et al. Fabrication of porous silicon oxycarbide ceramics by foaming polymer liquid and compression molding. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 111, n. 1299, p. 863–864, 2003.

KOUPAEI, N.; KARKHANEH, A.; DALIRI JOUPARI, M. Preparation and characterization of (PCL-crosslinked-PEG)/hydroxyapatite as bone tissue engineering scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 103, n. 12, p. 3919–3926, 2015.

LOCA, D. et al. Porous hydroxyapatite bioceramic scaffolds for drug delivery and bone regeneration. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 18, n. SYMPOSIUM 13, 2011.

LU, Y. et al. High-activity chitosan/nano hydroxyapatite/zoledronic acid scaffolds for simultaneous tumor inhibition, bone repair and infection eradication. **Materials Science and Engineering C**, v. 82, p. 225–233, 2018.

MACHADO, G. D. O. Preparação e caracterização de CMC e CMC graftizada. p. 113, 2000.

OHJI, T.; FUKUSHIMA, M. Macro-porous ceramics: Processing and properties. **International Materials Reviews**, v. 57, n. 2, p. 115–131, 2012.

OLIVEIRA, L. S. DE A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração

óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 37, 2010.

PARSONS, J. R. et al. Significance of the Porosity and Physical Chemistry of Calcium Phosphate Ceramics Biodegradation-Bioresorption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 523, n. 1, p. 268–271, 1988.

POLLICK, S. et al. Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 53, n. 8, p. 915–922, 1995.

PRASADH, S.; WONG, R. C. W. Unraveling the mechanical strength of biomaterials used as a bone scaffold in oral and maxillofacial defects. **Oral Science International**, v. 15, n. 2, p. 48–55, 2018.

R, P. et al. A novel biomaterial for osteotropic drug nanocarriers: synthesis and biocompatibility evaluation of a PLGA-ALE conjugate. **Nanomedicine**, v. 4, n. 2, p. 161–175, 2009.

SARKAR, S. K.; LEE, B. T. Hard tissue regeneration using bone substitutes: An update on innovations in materials. **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 30, n. 3, p. 279–293, 2015.

SCHLGL, R. Surface Composition and Structure of Active Carbons. **Handbook of Porous Solids**, p. 1863–1900, 2008.

SEPULVEDA, P. et al. In vivo evaluation of hydroxyapatite foams. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 4, p. 587–592, 2002.

SOPYAN, I. et al. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 8, n. 1–2, p. 116–123, 2007.

SOPYAN, I.; KAUR, J. Preparation and characterization of porous hydroxyapatite through polymeric sponge method. **Ceramics International**, v. 35, n. 8, p. 3161–3168, 2009.

TADIC, D. et al. A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering. **Biomaterials**, v. 25, n. 16, p. 3335–3340, 2004.

TAMPIERI, A. et al. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. **Biomaterials**, v. 22, n. 11, p. 1365–1370, 2001.

TSAI, S. W. et al. Fabrication and characteristics of porous hydroxyapatite-CaO composite nanofibers for biomedical applications. **Nanomaterials**, v. 8, n. 8, 2018.

YAMAN, F. et al. Guided bone regeneration with polyethylene membrane, zoledronic acid and hydroxiapatite bone graft in peri-implant bone defect: An experimental study. **Biomedical Research (India)**, v. 28, n. 6, p. 2684–2688, 2017.