



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
MATERIAIS

ERISANDRA RODRIGUES ALVES LOURENÇO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCIMENTOS DE APATITAS
NANOMÉTRICAS INCORPORADOS COM DIÓXIDO DE SILÍCIO PARA
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

FORTALEZA

2016

ERISANDRA RODRIGUES ALVES LOURENÇO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCIMENTOS DE APATITAS
NANOMÉTRICAS INCORPORADOS COM DIÓXIDO DE SILÍCIO PARA
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Materiais da Universidade Federal do Ceará, como requisito para à obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciências de Materiais.

Área de concentração: Propriedades Físicas e Mecânicas dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Emilio Ferreira Quevedo Nogueira.

Co-orientador: Prof. Dr. José Silvio Veras Albuquerque.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L933p Lourenço, Erisandra Rodrigues Alves.
Produção e caracterização de biocimentos de apatitas nanométricas incorporados com dióxido de silício para aplicações biomédicas / Erisandra Rodrigues Alves Lourenço. – 2016.
98 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira.
Coorientação: Prof. Dr. José Silvio Veras Albuquerque.
1. Biocimentos. 2. Biocerâmicas. 3. Fosfato de cálcio. 4. Dióxido de silício.

CDD 620.11

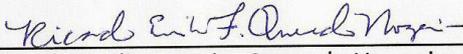
ERISANDRA RODRIGUES ALVES LOURENÇO

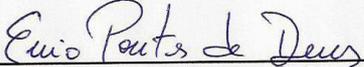
Produção e Caracterização de Biocimentos de Apatitas Nanométricas
Incorporados com Dióxido de Silício para Aplicações Biomédicas

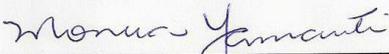
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Materiais.
Área de concentração: Propriedades Físicas e Mecânicas dos Materiais

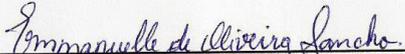
Aprovado em: 14/04/2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Ricardo Emilio Ferreira Quevedo Nogueira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Enio Pontes de Deus
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof^a. Mônica Yamauti
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)


Prof. Emmanuelle de Oliveira Sancho
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)


Prof. José Silvio Veras Albuquerque
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

AGRADECIMENTOS

A Deus que em todos os momentos da minha vida esteve presente, guiando-me com sua luz divina.

Ao meu esposo Mauricio pela presença constante em minha vida. Agradeço pela paciência, preocupação, incentivo e apoio aos estudos e principalmente pelo seu amor e carinho, ao meu filho mesmo sendo pequeno conseguiu alegrar meus dias.

Aos meus familiares pelo incentivo e apoio, minha eterna gratidão: Erivanda (irmã), Eudes (cunhado), Edilberto (irmão) e em especial aos meus pais Marcos (em memória) e Maria de Nazaré pelas constantes demonstrações de carinho, dedicação, incentivo, apoio aos meus estudos e orações.

Ao professor Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira, pela orientação, sugestões, amizade e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais e a UFC pela oportunidade de realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, pelo apoio financeiro.

Ao meu amigo José Silvío pelas trocas de experiências a respeito da ampla área de biomateriais que foi fundamental para este trabalho e amizade que muito colaboraram para o meu aprendizado.

Aos meus colegas do Laboratório de BIOMATERIAIS e meus amigos da universidade pelo apoio, amizade, ajuda e sugestões que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos os professores da banca pela disponibilidade e ajuda deste trabalho.

Aos laboratórios da UFC (Raios-x, Bioinorgânica, LACAM, Laboratório de Odontologia) e ao laboratório de Tecnologia da Biomassa da Embrapa, pela colaboração ao desenvolvimento deste trabalho com análises.

Ao laboratório da Universidade de Granada, na Espanha, pela a realização dos ensaios de citotoxicidade, que favoreceu o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus professores pelo profissionalismo e ensinamentos fornecidos.

As minhas amigas e amigos que torceram por mim, mesmos estando longe.

A todos que ajudaram ou contribuíram direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho.

RESUMO

Os biocimentos de fosfato de cálcio apresentam alta osteocondutividade, facilidade de moldagem e manipulação, além de excelentes biocompatibilidade e bioatividade. No entanto, sua utilização é limitada a aplicações de baixa carga, devido principalmente à sua baixa resistência mecânica. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar biocimentos a partir de biocerâmicas de fosfato de cálcio obtidos por precipitação em solução aquosa, mediante a incorporação de dióxido de silício nanométrico. Os biocimentos foram produzidos em laboratório com a adição de dióxido de silício nanométrico (nas proporções de 10%, 20%, 30% e 40% em peso) ao beta fosfato tricálcio nanométrico. As amostras foram caracterizadas por difração de raios X, espectroscopia no infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, teste de pH, ensaio de resistência mecânica por compressão diametral e caracterizações biológicas. Com os resultados de raios X foi possível identificar os picos representativos da brushita, do beta fosfato tricálcio, além de traços de silicato tricálcio e carbonato de cálcio. Observa-se que o aditivo interfere na dissociação do beta fosfato tricálcio para a formação da brushita, e favorece a formação do silicato tricálcio, que reduz a dissociação do beta fosfato tricálcio. Na análise de infravermelho foi possível identificar os grupos funcionais dos fosfatos e as bandas de dióxido de silício presentes nos biocimentos. Os resultados obtidos na análise de caracterização morfológica apresentaram uma superfície formada por cristais de brushita em forma de placas envolvidos por partículas aglomeradas provavelmente, de beta fosfato tricálcio/dióxido de silício. Os ensaios de resistência à tração por compressão diametral nas diferentes composições de biocimentos mostraram que a porcentagem de dióxido de silício presente influencia na resistência mecânica do material. Observa-se que a resistência mecânica aumenta com o teor do aditivo atingindo um limite a partir do qual passa a diminuir significativamente. O pH dos biocimentos obtidos ficou entre 6,0 e 6,5, estando próximo do intervalo de neutralidade. Na análise de citotoxicidade os biocimentos não produziram alterações no metabolismo das enzimas mitocondriais como também na integridade estrutural do núcleo e atividade enzimática citoplasmática das células. No líquido corporal simulado foi identificada a formação de uma apatita superfície do material, indicando

que o biocimento produzido é bioativo. De uma forma geral, os biocimentos produzidos são considerados viáveis para aplicações biomédicas.

Palavras- chave: Biocimentos. Biocerâmicas. Fosfato tricálcio. Dióxido de silício.

ABSTRACT

Calcium phosphate biocements exhibit high osteoconductivity, ease of molding and handling, as well as excellent biocompatibility and bioactivity. However, their use is limited to applications in which they are submitted to small loads, mainly due to their low mechanical strength. This study aimed at developing and characterizing biocements made from calcium phosphate bioceramics obtained by precipitation in aqueous solution, with the incorporation of nanometric silicon dioxide. The biocements were produced in the laboratory by adding nanometric silicon dioxide (in the proportions 10%, 20%, 30% and 40% by weight) to nanometric beta tricalcium phosphate. The samples were characterized by X-ray diffraction, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, pH testing, testing of mechanical strength by diametrical compression and biological characterizations. X-ray results exhibited peaks identified as brushite as well as peaks representative of beta tricalcium phosphate, besides traces of tricalcium silicate and calcium carbonate. It is observed that the additive interferes with dissociation of beta tricalcium phosphate for the formation of brushite, and favors the formation of tricalcium silicate, which reduces the dissociation of beta tricalcium phosphate. In the analysis of infrared it was possible to identify functional groups of the phosphates and silicon dioxide bands present in biocements. Results of the morphological analysis showed a surface formed by brushite crystals in the form of plates surrounded by agglomerated particles (probably beta tricalcium phosphate / silicon dioxide). Tensile tests by diametrical compression for the various compositions of biocements showed that the percentage of silicon dioxide present influences the mechanical strength of the material. Additions of silicon dioxide improve mechanical strength up to a certain level, after which they become deleterious to strength. The pH of the obtained biocements remained 6.0 and 6.5, close to the neutral range. Analysis of cytotoxicity of biocements showed that they did not affect the metabolism of mitochondrial enzymes, neither in the structural integrity of the nucleus nor in the cytoplasmic enzymatic activity of cells. In SBF solution, formation of an apatite on the surface of the material indicates that the biocement produced is bioactive. In general, the biocements produced are considered viable for biomedical applications.

Keywords: Biocements. Bioceramics. Tricalcium phosphate. Silicon dioxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Aplicações das biocerâmicas no esqueleto humano.....	20
Figura 2 –	Fosfato Tricálcio.....	22
Figura 3–	Estrutura do osso longo com uma ampliação do osso cortical.....	34
Figura 4 –	Distribuição de tensão e secção transversal em uma amostra submetida a ensaio de compressão diametral.....	37
Figura 5 –	Fluxograma das etapas para a obtenção dos biocimentos.....	47
Figura 6 –	Difratogramade raios X do BIOC00.....	55
Figura 7 –	Difratogramade raios X do BIOC10.....	55
Figura 8 –	Difratogramade raios X do BIOC20.....	56
Figura 9 –	Difratogramade raios X do BIOC30.....	56
Figura 10 –	Espectrograma de infravermelho do BIOC00.....	58
Figura 11 –	Espectrograma de infravermelho do BIOC10.....	58
Figura 12 –	Espectrograma de infravermelho do BIOC20.....	59
Figura 13 –	Espectrograma de infravermelho do BIOC30.....	59
Figura 14 –	Morfologia referente ao BIOC00.....	60
Figura 15 –	Morfologia referente ao BIOC10.....	61
Figura 16 –	Morfologia referente ao BIOC20.....	61
Figura 17 –	Morfologia referente ao BIOC30.....	62
Figura 18 –	Ensaio de resistência à compressão diametral.....	64
Figura 19 –	Teste de Tukey-Kramer do ensaio de compressão.....	65
Figura 20 –	Ensaio de pH dos biocimentos.....	67
Figura 21 –	Teste de Tukey-Kramer do ensaio de pH.....	68
Figura 22 –	Resultados da quantificação das médias das absorbâncias referentes aos diferentes períodos de exposição.....	69
Figura 23 –	Imagens representativas de FMOH expostos ao biocimento e analisados pelo teste LIVE/DEAD™. Células verdes correspondem a células vivas e as células vermelhas representam as mortas. Imagens correspondentes aos períodos de exposição de 1 hora (A), 12 horas (B), 24 horas (C) e controle (D).....	71
Figura 24 –	Resultados da quantificação do número de células vivas em porcentagem referentes aos diferentes períodos de exposição.....	72

Figura 25 – Difratoograma de raios X dos biocimentos do teste <i>in vitro</i>	74
Figura 26 – Morfologia referente ao teste <i>in vitro</i> do biocimento.....	75
Figura 27 – Difratoograma de raios X do pó sinterizado a 1200°C.....	91
Figura 28 – Espectrograma de infravermelho do pó.....	92
Figura 29 – Difratoograma de raios X do dióxido de silício.....	93
Figura 30 – Espectrograma de infravermelho do dióxido de silício.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Setores de aplicação das nanotecnologias	14
Tabela 2 –	Estruturas cristalinas e parâmetros de rede das diferentes fases do TCP.....	23
Tabela 3 –	Compostos utilizados em composições de CFC.....	25
Tabela 4 –	Notações e organização dos dados para aplicação de método ANOVA.....	39
Tabela 5 –	Quadro de análise de variância (ANOVA).....	44
Tabela 6 –	Quantidade de reagentes requeridas para o preparo das soluções A e B.....	52
Tabela 7 –	Resultados de resistência à compressão diametral.....	63
Tabela 8 –	Análise de variância de resistência a compressão diametral.....	64
Tabela 9 –	Planilha dos resultados dos ensaios de pH dos biocimentos.....	66
Tabela 10 –	Análise de variância do pH dos biocimentos.....	67
Tabela 11 –	Análise de variância ANOVA para comparação global entre os grupos experimentais ^a . Teste de Levene para análise de variância (ANOVA) ^b . Teste de Tukey da diferença significativa entre pares de grupos experimentais ^c . Todos os testes estatísticos foram realizados para cada ensaio.....	70
Tabela 12 –	Resultados da análise de BET.....	93
Tabela 13 –	Teste de Levene correspondente à compressão diametral dos biocimentos.....	95
Tabela 14 –	Teste de Levene correspondente ao pH dos biocimentos.....	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Nanotecnologia.....	13
2.1.1	<i>Nanopartículas</i>	14
2.2	Biomateriais.....	17
2.3	Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio.....	20
2.4	Cimentos de Fosfato de Cálcio.....	24
2.5	Aplicações dos Biocimentos	26
2.6	Cimento de Hidrogenofosfato de Cálcio Diidratado (DCPD).....	27
2.7	Dióxido de Silício.....	29
2.8	Testes Biológicos.....	30
2.9	Fisiologia do Osso.....	33
2.10	Resistência à Compressão Diametral.....	36
2.11	Análise de Variância (ANOVA).....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1	Reagentes usados para preparação dos Biocimentos.....	45
3.2	Obtenção dos pós para a utilização na formulação dos Biocimentos.....	45
3.3	Elaboração dos Biocimentos.....	46
3.4	Caracterização dos Biocimentos.....	48
3.4.1	<i>Difração de Raios X</i>	48
3.4.2	<i>Espectroscopia no Infravermelho</i>	48
3.4.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	48
3.4.4	<i>Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)</i>	49
3.4.5	<i>Ensaio de Resistência à Compressão Diametral</i>	49
3.4.6	<i>Testes Biológicos</i>	49
3.4.6.1	<i>Teste de Citotoxicidade do Biocimento</i>	49
3.4.6.2	<i>Teste In Vitro dos Biocimentos</i>	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1	Difração de Raios X dos Biocimentos.....	54
4.2	Espectrogramas de Infravermelho dos Biocimentos.....	57
4.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	60

4.4	Ensaio de Compressão Diametral.....	62
4.5	Teste de pH.....	66
4.6	Testes Biológicos.....	69
4.6.1	<i>Teste de Citotoxicidade do Biocimento</i>	69
4.6.2	<i>Teste In Vitro dos Biocimentos</i>	73
5	CONCLUSÃO	77
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	79
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO DO PÓ E DO ADITIVO.....	91
	APÊNDICE B – TESTE DE HOMOGENEIDADE DA VARIÂNCIA DOS BIOCIMENTOS.....	95
	PUBLICAÇÕES.....	96

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa em novos materiais sintéticos para uso na área médica, ortopedia e odontologia, vem tendo grandes avanços para solucionar ou amenizar problemas relativos à saúde humana. Neste contexto a pesquisa e/ou investigação vem contribuindo para o aumento na expectativa de vida da população. O aumento na expectativa de vida, por sua vez, tem resultado em um crescente número de casos de pacientes com osteoporose e lesões do tecido ósseo decorrentes da idade avançada. Além disso, verifica-se o aumento do número de lesões do tecido ósseo, também entre jovens, devido a traumatismos como acidentes automobilísticos e de trabalho: o tecido fica vulnerável às fraturas, o que se deve às perdas de densidade e resistência (RIBEIRO, 2003). Para utilização em clínica odontológica, os materiais sintéticos na última década tem representado um excelente instrumento terapêutico nas atividades cirúrgicas, especialmente nas correções de defeitos ósseos (BUGARIN JUNIOR; GARRAFA, 2007).

Após uma lesão ou doença, o osso pode reconstruir-se por meio de processos fisiológicos de regeneração ou cicatrização. Há mais de um século esforços tem sido feitos para encontrar materiais adequados para a restauração ou substituição do osso nos seres humanos. A necessidade de alternativas para o reparo e substituição de tecidos vivos vitimados incentivou cientistas a buscarem materiais sintéticos que facilitem a reparação óssea (ANDRADE; DOMINGUES, 2006).

Dentre os materiais sintéticos usados para reposição do tecido ósseo em aplicações médicas, as biocerâmicas se destacam devido à sua similaridade química e estrutural com a fase mineral presente em ossos e dentes e biocompatibilidade elevada. Por sua vez, os biocimentos de fosfato de cálcio se apresentam como uma alternativa clínica frente às biocerâmicas de fosfato de cálcio utilizadas como material de implante por excelência na substituição e reparo do tecido ósseo (BOHNER, 2000). Esses biocimentos são constituídos por um pó e um líquido, os quais, ao serem misturados formam uma pasta que endurece espontaneamente à temperatura ambiente, dando origem a um precipitado.

As grandes vantagens dos biocimentos de fosfato de cálcio se devem à capacidade de adaptação ao defeito ósseo a corrigir, devido à possibilidade de serem moldados ou injetados através de vias minimamente invasivas, conservando

a resposta biológica e osteocondutividade características das biocerâmicas (BOHNER, 2000). No entanto, à sua fragilidade, baixa resistência mecânica à tração e à flexão e baixa resistência ao impacto segue sendo o principal problema dos biocimentos de fosfato de cálcio em aplicações clínicas onde sejam requisitadas altas exigências mecânicas.

Numerosos estudos existem, voltados à melhoria do desempenho mecânico dos biocimentos de fosfato de cálcio, desde seu surgimento no mercado. Exemplo disto são realizados para regular a razão líquido/pó, através do uso de diferentes aditivos redutores ou aceleradores, aditivos para aumentar a resistência mecânica, adição de fibras de reforço, dentre outros (GARCÍA *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2003).

A preparação de biocimentos de fosfato de cálcio dopados com sílica é um campo que está atraindo cada vez mais atenção. A abordagem mais comum é baseada na combinação de pó de fosfato de cálcio com pó de silicato de cálcio (HUAN; CHANG, 2009) e (ZHAO *et al.*, 2010) ou de um líquido contendo silicato (SU *et al.*, 2011). A sílica é um material inerte quando interage com os fluidos corpóreos e com os compostos de fosfato de cálcio e, nestes casos, são esperadas melhorias na bioatividade (PIETAK *et al.*, 2007) e no potencial osteogênico do material (CAMIRÉ *et al.*, 2006). Nanopartículas de sílica foram utilizadas por Martin *et al.* (2004), para estudar seus efeitos na auto-organização de algumas redes de células. Essa pesquisa indica que nanopartículas de sílica podem auxiliar na organização e crescimento celulares.

Motivação para o trabalho

Há muitas décadas pesquisadores buscam materiais sintéticos que possam ser usados como possíveis substitutos para ossos com traumas e/ou defeituosos. Dentre os diversos materiais estudados, os que apresentam hoje em dia melhores resultados nas pesquisas estão os materiais compostos com fosfatos de cálcio, tendo respostas biológicas adequadas para a restauração ou substituição do tecido ósseo. Dentre estes materiais, os biocimentos produzidos a partir de biocerâmicas de fosfato de cálcio, além de apresentar as características das biocerâmicas, apresentam morfologia nanoestruturada, e, devido a essa característica possuem área superficial elevada, o que favorece a liberação dos íons

de Cálcio e Fósforo para o meio biológico, melhorando a velocidade de reabsorção e a formação da estrutura óssea.

Assim como as biocerâmicas, os biocimentos de fosfato de cálcio apresentam características mecânicas baixas, assim sendo, para melhorar o desempenho mecânico e possivelmente o biológico, incorporam-se aditivos. Dentre os diversos aditivos estudados optou-se pelo o silício, pois este é um elemento essencial necessário para a formação do osso saudável, e também, quando presente na estrutura dos cristais de fosfato de cálcio, geram materiais com características biológicas superiores, através da modificação das propriedades dos materiais e por efeitos diretos sobre os processos fisiológicos do tecido.

OBJETIVO

O objetivo geral do presente trabalho é o desenvolvimento e caracterização de biocimentos a partir de biocerâmicas de fosfato de cálcio obtido por precipitação em solução aquosa, mediante a incorporação de dióxido de silício nanométrico.

Objetivos Específicos:

- Produzir biocimentos a partir de formulações com diferentes teores de dióxido de silício nanométrico incorporado.
- Caracterização física, química e mecânica dos biocimentos produzidos.
- Caracterizações biológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia permite que cientistas, químicos, engenheiros, biólogos, entre outros, trabalhem em níveis celulares e moleculares a fim de produzir maiores avanços na tecnologia, na ciência e na saúde. Aplicações reais em larga escala de materiais nanométricos ainda não são muito comuns. Entretanto, a excelência de suas propriedades quando comparados aos seus equivalentes micro ou macroscópico, prevêem um futuro muito promissor para este campo (NIEMEYER, 2001; HOOD *et al.*, 2002 apud MAMANI, 2009).

O termo nanotecnologia refere-se ao estudo e à utilização de tecnologias que envolvem a criação e manipulação de materiais para o desenvolvimento de novos produtos, que tenham ao menos uma de suas dimensões físicas menores que, ou da ordem de, algumas dezenas de nanômetros, de modo a explorar novas características muitas vezes mais eficientes. O nanômetro corresponde à bilionésima parte de um metro, ou à divisão do metro em um bilhão de partes, ou seja, 1nm é igual a 10^{-9} m (MATOS; SANTOS; BARBOSA, 2011).

O interesse por materiais nanométricos ou nanopartículas vem das mudanças significativas nas propriedades dos produtos obtidos, as quais estão associadas às características, tais como: grande aumento de solubilidade, enormes mudanças nas propriedades de difusão, grande estabilidade microestrutural em relação ao crescimento de grão, aumento da resistência mecânica em materiais frágeis, diminuição no tamanho de falhas, super plasticidade e otimização de propriedades magnéticas. Estas melhorias são encontradas em casos específicos e estão longe de ser uma regra geral (CARREÑO *et al.*, 2008).

A nanotecnologia aproveita-se das novas propriedades que surgem nos materiais em escala nanométrica para desenvolver produtos e dispositivos para vários diferentes tipos de aplicações em diversos setores, tais como, a saúde, química, engenharia, comunicação, entre outros, alguns exemplos de aplicação pode ser observado na Tabela 1 (MATOS; SANTOS; BARBOSA, 2011).

Tabela 1 – Setores de aplicação das nanotecnologias.

Setor de Atividade	Alguns exemplos de aplicação atual
Químico	Pigmentos, pós cerâmicos, inibidores de corrosão; catalisadores multifuncionais; vidros anti-riscos e auto-laváveis; Têxteis e revestimentos antibacterianos e ultra-resistentes, isolamentos térmicos.
Engenharias	Células fotovoltaicas de nova geração; novos tipos de baterias; janelas inteligentes; materiais isolantes mais eficazes.
Saúde e cuidados médicos	Aparelhos e meio diagnóstico com nanodeteção; terapia genética; nano-implantes e próteses.
Cosmética	Crems solares transparentes, maquiagem mais duradoura.

Fonte: MATOS; SANTOS; BARBOSA, 2011.

Portanto, mais que a procura pelo simples benefício direto da redução de tamanho, a grande motivação para o desenvolvimento de objetos e dispositivos nanométricos está no fato de que novas e incomuns propriedades físicas e químicas, ausentes para o mesmo material quando de tamanho microscópico ou macroscópico, são observadas nessa nova escala. Por exemplo, uma amostra de um material metálico, naturalmente condutor de eletricidade, pode se tornar isolante em dimensões nanométricas (MELO; PIMENTA, 2004).

2.1.1 Nanopartículas

Nos possíveis mecanismos de formação de nanopartículas, estão envolvidas as etapas de nucleação e crescimento, etapas estas muito importantes na construção e produção de materiais nanoestruturados. Embora ainda não se conheçam completamente estes mecanismos, devido à sua complexidade, é indispensável estudar essas etapas e assim alcançar a habilidade de controlar sua distribuição de tamanho (HE, 2001).

Muitas rotas podem ser usadas na preparação de partículas nanométricas. As mais comuns são as reações químicas em solução, que tem se desenvolvido significativamente. Dentre estas reações, está a síntese por precipitação (formação de um sólido), na qual processos como nucleação, crescimento e aglomeração das partículas ocorrem simultaneamente (CUSHING; KOLESNICHENKO; O'CONNOR , 2004).

Devido à dificuldade de isolar cada um dos processos envolvidos nas reações de precipitação para estudá-los separadamente, seus mecanismos fundamentais não são conhecidos completamente. A teoria que envolve essas reações não é um assunto muito fácil, entretanto podem-se resumir as suas principais características como (CUSHING; KOLESNICHENKO; O'CONNOR , 2004):

- os produtos das reações de precipitação são geralmente espécies pouco solúveis (sob condições de supersaturação); estas condições determinam que a nucleação seja uma etapa fundamental nessas reações e que um grande número de partículas pequenas será formado;
- processos secundários, como amadurecimento de Ostwald (fenômeno pelo qual partículas muito pequenas são essencialmente consumidas pelas partículas maiores, durante o processo de crescimento) e agregação, afetarão significativamente o tamanho, a morfologia e as propriedades dos produtos;
- as condições de supersaturação fundamentais para induzir a precipitação são comumente o resultado de reações químicas. Dessa maneira, quaisquer condições de reação, como taxa de adição de reagentes, tipo de redutor, uso de estabilizante e taxa de agitação, podem influenciar o processo de mistura e podem ser relevantes no controle do tamanho, morfologia e distribuição de tamanho da partícula.

Uma das condições para se utilizar uma amostra em vários estudos e em possíveis aplicações é que esta apresente distribuição de tamanho nanoparticulado. Entretanto, essas condições dependem fundamentalmente dos processos de nucleação e crescimento que controlam o tamanho e a morfologia do sólido que será formado (CUSHING; KOLESNICHENKO; O'CONNOR, 2004).

Para entendermos melhor como se dão as etapas de nucleação e crescimento, consideremos uma reação química por precipitação, quando a precipitação começa, um grande número de cristalitos (núcleos) é formado inicialmente (etapa de nucleação), mas estes tendem a se agregar de forma rápida para constituir cristais maiores e mais estáveis termodinamicamente (etapa de crescimento). No que se refere à etapa de nucleação, o grau de supersaturação é a chave para qualquer processo de precipitação. É conhecido que a etapa de nucleação pode ocorrer de duas maneiras: nucleação homogênea e nucleação heterogênea (CUSHING; KOLESNICHENKO; O'CONNOR, 2004).

O processo de nucleação homogênea envolve uma transformação de fase e a criação de uma interface entre as duas fases (líquida e sólida). Neste processo, um pequeno número de íons se reúne para formar um sólido, chamado de embrião, íons são adicionados e subtraídos do embrião aleatoriamente, à medida que o embrião cresce sua energia livre inicialmente aumenta devido ao aumento de energia superficial. Entretanto, somente poucos embriões entre os muitos formados continuam a crescer. Eventualmente, um tamanho crítico de embrião é alcançado, além do qual a energia livre decresce com o aumento do tamanho, pois a razão superfície-volume diminui o suficiente para vencer a influência da energia superficial (COSTA, 1988).

Na nucleação homogênea, não se considera a influência de outros sólidos além da fase precipitante, entretanto, na prática, o efeito de impurezas é bastante pronunciado. A presença de impurezas no meio precipitante catalisa a nucleação no sentido em que esta se inicia em um nível de supersaturação mais reduzido do que o necessário na ausência desses elementos estranhos. As impurezas oferecem superfícies nas quais as espécies químicas podem adsorver e, quer por difusão na superfície originar a formação de um núcleo superficial, quer em sítios ativos presentes iniciar o crescimento. Este tipo de nucleação é denominado de nucleação heterogênea (COSTA, 1988)

A nucleação heterogênea ocorre em um grau de supersaturação mais reduzido do que aquele exigido para a nucleação homogênea. Assim, este último processo é verificado somente se uma considerável supersaturação for usada. A relação entre a supersaturação inicial e o número final de partículas é crucial para a diferenciação dos processos de nucleação homogênea e heterogênea (COSTA, 1988).

Quanto à etapa de crescimento das partículas, a difusão é o principal fator dominante deste processo. Quando um novo material é adicionado à superfície da partícula, gradientes de concentração e temperatura são fatores predominantes que determinam a velocidade da reação. A formação de um núcleo estável, através de colisões entre os vários átomos é possível desde que um número crítico desses átomos esteja presente no meio reacional. A probabilidade de colisão entre o átomo e o núcleo já formado é muito maior que a probabilidade de nucleação. Uma vez os núcleos já formados, o processo de crescimento ocorre mais rapidamente do que a nucleação (CHEN; HSIEH, 2002). A etapa de nucleação na síntese de nanopartículas, através de precipitação, deve ser relativamente rápida e a de crescimento relativamente lenta (OLIVEIRA, 2005).

A primeira condição que deve ser cumprida para se obter partículas nanométricas é que as etapas de nucleação e crescimento ocorram separadamente. Dessa maneira, reações de precipitação homogênea são comumente utilizadas na preparação dessas partículas. De um modo em geral, em rotas químicas para a preparação de nanopartículas, as etapas de nucleação e crescimento são muito importantes na formação. Neste sentido, a escolha dos precursores, meio reacional e condições de síntese serão determinantes nas características dos materiais que serão obtidos (VIAU *et al.*, 1996).

2.2 Biomateriais

O termo biomaterial foi definido por Williams (1999a) como sendo: “Qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo”.

Outra definição abrangente é a de Park e Bronzino (2002), na qual os autores definem biomaterial como sendo todos os materiais que de modo contínuo ou intermitente, entram em contato com fluidos corpóreos, mesmo que estejam localizados fora do corpo.

Os biomateriais apresentam três características (PETTO DE SOUZA, 2009):

a) Biocompatibilidade: é a habilidade de um material desempenhar com

uma resposta tecidual apropriada em uma aplicação específica (WILLIAMS, 1987b apud ALVES, 2011).

b) Biofuncionalidade: está relacionada à capacidade do biomaterial desempenhar as funções estéticas e dinâmicas desejadas no meio implantado.

c) Bioatividade: é a capacidade que o biomaterial apresenta de interagir com tecidos vivos, estimulando os processos físico-químicos naturais ao sistema biológico favorecendo assim, a integração do biomaterial com o sistema receptor. Característica não necessariamente obrigatória.

Os biomateriais podem ser: metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos. Implantes de materiais compósitos bioativos – combinação de biocerâmicas e biovidros, biocerâmicas e fibras poliméricas, unem características de classes de materiais que os tornam adequados a determinados tipos de aplicações, ou seja, implantes dentários, aplicações ortopédicas, reparos cranianos e outros.

Quanto à resposta biológica, os biomateriais podem ser classificados em:

- Materiais bioinertes: esses materiais são tolerados pelo organismo e praticamente não liberam nenhum tipo de componente. Esses materiais tendem a ser envolvidos por uma fina cápsula fibrosa, praticamente inexistente. São menos suscetíveis a causar uma reação biológica adversa ao organismo, por serem quimicamente estáveis. As cerâmicas bioinertes mais empregadas são: cerâmicas à base de carbono, alumina e zircônia (CARNEIRO, 2007).

- Materiais bioreativos: os metais utilizados em ortopedia e em implantodontia dominam essa classe de materiais. No entanto, a maioria dos biomateriais metálicos não é bioreativo, ficando mais próxima à classe dos materiais bioinertes. Os metais classificados como bioreativos ficam no limite entre os materiais bioinertes e os bioativos. Esses metais adquirem bioatividade após um tratamento de ativação de superfície do seu óxido. São eles o titânio, o nióbio e o tântalo (CARNEIRO, 2007).

- Materiais bioativos: o material bioativo permite uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo, possibilitando a formação de uma ligação entre o tecido e o próprio material. Neste caso, o tecido é capaz de interagir intimamente com o material depositando-se diretamente sobre a superfície do mesmo sem a intervenção da camada de tecido fibroso. A natureza dessa ligação osso-implante, no caso destes materiais parece ser do tipo química, sendo que nessa ligação o papel fundamental parece ser feito pelos componentes orgânicos e

minerais presentes no fluído do corpo humano. Dentre os materiais bioativos mais usados temos: os vidros bioativos e as biocerâmicas de fosfato de cálcio (ALBUQUERQUE, 2004).

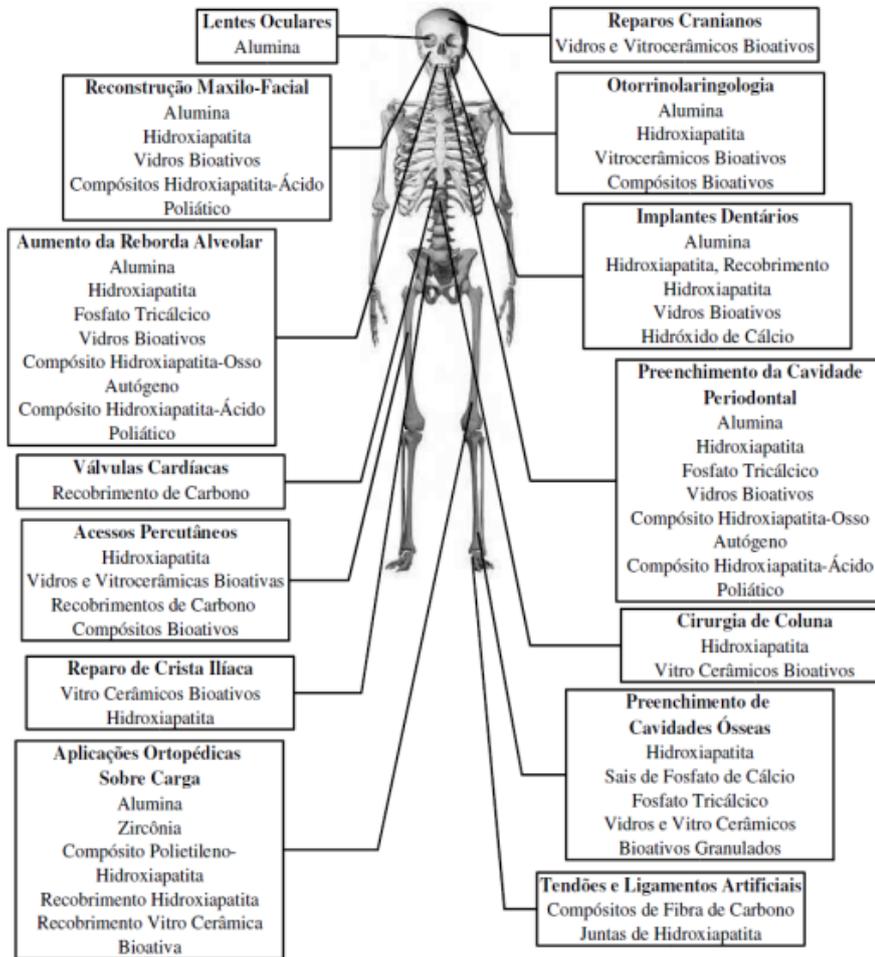
- Materiais reabsorvíveis: são materiais que atuam por um determinado período junto aos tecidos biológicos, e depois são degradados, solubilizados ou fagocitados (processo de ingestão e destruição de partículas sólidas, como bactérias ou pedaços de tecido necrosado, por células amebóides chamadas de fagócitos, que tem como uma das funções a proteção do organismo contra infecções) pelo organismo. Este material, após atuar no organismo, é eliminado sem necessidade de outra intervenção cirúrgica. Os mais conhecidos são: o fosfato tricálcio e ácido poli (ácido láctico) (HENCH; WILSON, 1993 apud ALVES, 2011). Os produtos formados pela degradação desses materiais não podem ser tóxicos, pois são eliminados pelo metabolismo do paciente.

Atualmente os biomateriais são utilizados em diversas áreas da clinicas, ortopedia, odontologia e inclusive na área de fármacos. Os produtos são variados, como prótese ocular, substituição óssea, articulações, válvulas cardíacas, tecido cutâneo, prótese mamária, próteses ortopédicas e muitos outros. Na área de fármacos existem os polímeros que liberam o medicamento de forma controlada, conforme ele é absorvido pelo organismo (RODRIGUES, 2008).

Na odontologia, os biomateriais mais utilizados incluem: hidroxiapatita (HA), beta fosfato tricálcio (β -TCP), polímeros e outros. A HA é um fosfato de cálcio hidratado, principal componente (cerca de 95%) da fase mineral dos ossos e dentes humanos. Entre as indicações de uso está o reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas; aumento de rebordo alveolar; regeneração guiada de tecidos ósseos; reconstrução bucomaxilofacial; reparo e substituição de paredes orbitais; e substituição do globo ocular. O β -TCP é um típico substituto ósseo sintético utilizado na odontologia em uma série de casos para tratamento de lesões ósseas periodontais, bem como na cirurgia bucomaxilofacial, tem sido utilizado na prática clínica devido a sua facilidade de manipulação e capacidade de regenerar quantidade adequada de osso (DANTAS *et al.*, 2011).

Na Figura 1 podemos observar algumas aplicações das biocerâmicas de fosfato de cálcio no esqueleto humano.

Figura 1 – Aplicações das biocerâmicas no esqueleto humano



Fonte: HENCH E WILSON, 1993 apud ALVES, 2011.

2.3 Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio

Os materiais cerâmicos estão sendo utilizados como biomateriais há muitos anos. Inicialmente a atenção era voltada para o desenvolvimento de materiais cerâmicos que provocassem uma mínima ou nenhuma reação do tecido quando utilizado. Com o decorrer do tempo, o desenvolvimento das técnicas e o aumento do conhecimento na área dos materiais cerâmicos, surgiram as biocerâmicas (SILVA; PEREIRA, 2012). As biocerâmicas são materiais sólidos inorgânicos quimicamente inertes, constituídos, de uma forma geral, de uma ou mais fases descontínuas (dimensões inferior a 150 nm), dispersas dentro de uma fase contínua (GLEITER, 1994).

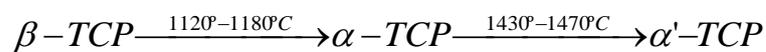
As biocerâmicas de fosfato de cálcio apresentam características mineralógicas semelhantes à apatita óssea do esqueleto humano, boa biocompatibilidade com o meio fisiológico e fortes ligações com o tecido ósseo. A descoberta, por cientistas, de que a fase mineral dos ossos e dentes consistia de sais de fosfato de cálcio motivou pesquisas sobre o uso desses sais obtidos em laboratórios como materiais úteis na consolidação de fraturas ósseas (ALBUQUERQUE, 2004).

O sucesso na reparação óssea usando materiais cerâmicos de fosfato de cálcio foi descrito pela primeira vez, em 1920, por Albee. Entretanto, somente quando foram desenvolvidas as técnicas de conformação de materiais cerâmicos, ao redor de 1960, é que a utilização dos fosfatos de cálcio como biomaterial foi consolidada. Em 1969, Levitt *et al.* e Monroe, em 1971, descreveram um método de preparação de uma apatita a partir do mineral fluorapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, e sugeriram o seu possível uso em aplicações médicas e odontológicas. Em 1974 foi publicada a primeira aplicação odontológica do beta fosfato de cálcio no tratamento de doenças periodontais (RIBEIRO, 2003).

Trabalhos relacionados à síntese de pós biocerâmicos de fosfato de cálcio tem sido desenvolvidos em laboratório (YEONG *et al.*, 2001; YOSHICO *et al.*, 1993), por estas apresentarem um comportamento de regeneração do tecido ósseo e sua biodegradação acelerada, devido à superfície de área elevada. Cunha *et al.* em 2006 sintetizaram, pelo método via úmida, pós de biocerâmicas de fosfato de cálcio e obtiveram, após tratamentos térmicos em diferentes condições de temperaturas (600°C, 800°C e 1000°C), diferentes características de morfologia, observando um aumento gradual no diâmetro médio dessas nanopartículas e uma redução da área superficial.

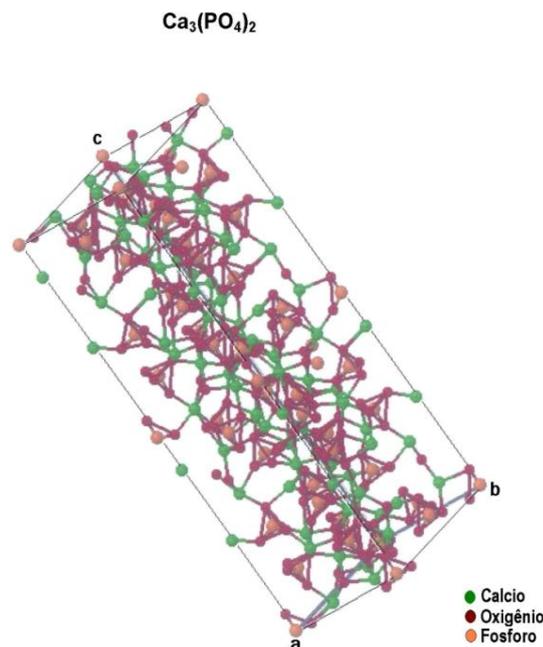
As biocerâmicas de fosfato de cálcio não induzem qualquer reação imunológica ou tóxica indesejável quando implantadas no corpo humano. A inserção de um implante no corpo humano causa interações entre a superfície do implante e os líquidos corporais. Na interface do implante, acontecem reações em escala molecular do tipo dissolução de íons do material, adsorção e desnaturação de proteínas (KLEIN; WOLKE; DE GROOT, 1993). No caso da superfície em contato com os fluidos corporais ser um fosfato de cálcio, pode ocorrer reabsorção do mesmo ou transformação em outro fosfato de cálcio mais estável.

Dentre os materiais sintéticos de fosfato de cálcio que apresentam velocidade de reabsorção apreciável, o fosfato tricálcio (TCP), com razão Ca/P igual a 1,5 (Figura 2) é o mais estudado. Este material é biodegradável e biocompatível, sendo parcialmente reabsorvido entre seis e quinze semanas após o implante. O TCP ocorre em várias calcificações patológicas, como cálculos dentários e urinários e é o principal constituinte de cáries dentárias. Pode apresentar quatro formas alotrópicas, onde as temperaturas de transição e a sequência de ocorrência são (GUASTALDI; APARECIDA, 2010):



a fase γ -TCP (gama fosfato tricálcio) só ocorre em altas pressões. A estrutura cristalina e os parâmetros de rede de cada fase são apresentados na Tabela 2. A estrutura cristalina da fase α' -TCP não é conhecida devido à dificuldade de preparação que requer temperaturas superiores a 1430°C. Além disso, reverte a fase α -TCP quando resfriado a temperaturas inferiores a de transição (CARRODEGUAS *et al.*, 2008).

Figura 2 – Fosfato Tricálcio.



Fonte: BASES DE DADOS DA CAPES, 2010.

Tabela 2 – Estruturas cristalinas e parâmetros de rede das diferentes fases do TCP.

Fase	Parâmetros de rede	Sistema
β -TCP	a=b=1,043nm c=3,737nm	Romboédrico
α -TCP	a=1,287nm b=2,728nm c=1,521nm	Monoclínico
γ -TCP	a=0,524nm c=1,867nm	Romboédrico

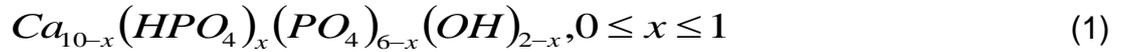
Fonte: GUASTALDI; APARECIDA, 2010.

As principais propriedades apresentadas pelo TCP incluem (GUASTALDI; APARECIDA, 2010):

- a) possibilidade de substituições catiônicas: a forma alotrópica β -TCP possibilita que até cerca de 15% dos íons Ca^{+2} sejam trocados por Mg^{+2} sem mudanças significativas em sua estrutura, originando o composto denominado de β -TCP substituído por magnésio;
- b) bioatividade e osteocondutividade (habilidade de um material agir passivamente como uma ponte): as formas alotrópicas α e β -TCP exibem a mesma habilidade de osteocondução, porém a fase α -TCP apresenta maior bioatividade, sendo este fato atribuído ao arranjo estrutural desta fase que possibilita que maior quantidade de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} sejam trocados com o meio biológico;
- c) biodegradação: a utilização do TCP juntamente com a Hidroxiapatita (HA) tem sido uma alternativa viável para aumentar a velocidade de reabsorção da HA. Nestes casos, a velocidade de dissolução da mistura HA/TCP é controlada pela quantidade de TCP utilizado.

O beta fosfato tricálcio (β -TCP) não pode ser precipitado em solução aquosa, estando sua obtenção associada à transformação de fase em estado sólido de hidroxiapatita deficiente em cálcio submetida a temperaturas acima de 700°C (SENA, 2004). A hidroxiapatita deficiente em cálcio sintetizada é geralmente caracterizada pela razão Ca/P, sua razão molar pode variar de 1,5 a 1,67. Sua

composição química pode ser expressa pela fórmula geral apresentada na Equação 1. O grau da não estequiometria depende do método de síntese empregado (GOUVEIA, 2008).



Uma variedade de métodos tem sido proposta para sintetizar a hidroxiapatita deficiente de cálcio. Um dos mais utilizados é o de precipitação com temperatura variando de 25° a 100°C. De acordo com a literatura, o pH inicial da suspensão deve ser menor que 12 e, após a síntese, o pH final obtido deve ser igual a 5 (RAMALHO, 2006). Os processos de precipitação consistem na adição de grupos fosfatos a suspensões que contenham íons cálcio, podendo partir de diferentes reagentes. Uma forma de classificar os vários fosfatos de cálcio é por meio de sua razão molar Ca/P. Vários fosfatos de cálcio que possuem razão variando de 0,5 a 2,0 podem ser sintetizados por precipitação a partir soluções contendo íons de cálcio e fosfato, sob condições ácidas ou alcalinas (KAWACHI *et al.*, 2000)

2.4 Cimentos de Fosfato de Cálcio

Dentre os biomateriais aplicados como possíveis substitutos ósseos, os cimentos de fosfatos de cálcio (CFC's) tem despertado grande interesse em função da excelente biocompatibilidade e bioatividade, além de seu endurecimento "*in situ*", adequando-se a pequenas cavidades sem a necessidade de dar forma às mesmas. Os CFC's foram descobertos por pesquisadores no início dos anos 80, quando eles ao misturar alguns fosfatos de cálcio com soluções aquosas produziam uma pasta viscosa que quando implantada endurecia dentro do organismo formando hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA, $Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5OH$) ou brushita (DCPD, $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$), materiais biocompatíveis que quando implantados são reabsorvidos pelo organismo dando origem a um novo tecido ósseo (BOHNER, 2000).

Ainda nos anos 80 Gruninger e colaboradores introduziram o termo "cimento de fosfato de cálcio". Um cimento deste tipo pode ser preparado misturando um sal de fosfato de cálcio com água ou com uma solução aquosa para

que se forme uma pasta que possa reagir à temperatura ambiente ou corporal, dando origem a um precipitado que contenha um ou mais fosfatos de cálcio, ocorrendo a pega pelo intercruzamento dos cristais deste precipitado (MACHADO, 2007). Os principais compostos utilizados nas composições dos CFC's estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Compostos utilizados em composições de CFC.

Abreviatura	Nome	Formula
MCPM	Diidrogenofosfato de cálcio monoidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)2\text{H}_2\text{O}$
DCPD	Hidrogenofosfato de cálcio diidratado (Brushita)	$\text{CaHPO}_4.2\text{H}_2\text{O}$
DCP	Hidrogenofosfato de cálcio (monetita)	CaHPO_4
OCP	Fosfato octacálcio	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6.5\text{H}_2\text{O}$
TCP (α,β)	Fosfato Tricálcio	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
HÁ	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$
TTCP	Fosfato tetracálcio	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$
CC	Carbonato de cálcio	CaCO_3
CSH	Sulfato de cálcio hemihidratado	$\text{CaSO}_4. \text{H}_2\text{O}$

Fonte: ALBUQUERQUE, 2012.

Os CFC's apresentam alta osteocondutividade, facilidade de moldagem, fácil manipulação, porém tem seus usos limitados a aplicações de baixa carga, devido principalmente à sua baixa resistência mecânica, além da cinética lenta da reação de cura. A pesquisa e o desenvolvimento de cimentos mais resistentes estão expandindo o uso desses cimentos (BOHNER, 2000). Tem-se desenvolvido diferentes tipos de CFC, pode-se agrupar em três grandes categorias (CARRODÉGUAS, 2000):

- a) baseados em beta fosfato tricálcio e ácido fosfórico (H_3PO_4) ou Hidrogenofosfato de cálcio que ao reagir originam uma fase de Hidrogenofosfato de cálcio diidratado;
- b) baseados em alfa fosfato tricálcio (α -TCP) que formam uma fase de hidroxiapatita deficiente de cálcio com excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteointegração;

c) baseados em fosfato tetracálcio e fosfato dicálcio, que formam uma hidroxiapatita precipitada.

Materiais com alta resistência à compressão são desejáveis para estabilização de fraturas ósseas cominutivas, ou para regiões que requerem grande suporte para os tecidos moles. Materiais com baixa resistência à compressão podem ser desejáveis como ponte de união entre pequenos defeitos ósseos como materiais obturadores de canais radiculares ou tratamento de defeitos ósseos periodontais (SCHMITZ; HOLLINGER; MILAM, 1999).

Os estudos com CFC's procuram constantemente modificá-los a fim de melhorar a resistência mecânica e acelerar a cinética desses materiais. Uma das alterações mais comuns que retorna resultados satisfatórios no aumento da resistência mecânica e aceleração da reação de pega é a utilização de aditivos, espera-se que a dopagem com aditivos possam apresentar grandes avanços no desenvolvimento de novos sistemas de fosfatos de cálcio e também possam melhorar a biocompatibilidade, a bioatividade, a osteocondução e a osteoindução (LEROX; PEREZ-ORDONEZ; VON SCHROEDER, 2007).

2.5 Aplicações dos Biocimentos

Os CFC's foram introduzidos na prática cirúrgica como auxiliares na fixação interna para tratamento de fraturas específicas. O objetivo da utilização dos biocimentos é preencher espaços na metáfise óssea, reduzindo a necessidade de enxertos ósseos. Estudos em cadáveres demonstraram que estes cimentos empregados junto com implantes metálicos em algumas fraturas em rádio distal, platô tibial, fêmur proximal e calcâneo podem produzir boa estabilidade e melhoria da força de fixação (LARSSON; BAUER, 2002).

Os cimentos de fosfato de cálcio não atuam como substituto permanente do osso, apenas temporários, sendo lentamente substituído por tecido ósseo de nova formação. Esse comportamento tem sido denominado de osteotransdutividade. A velocidade em que esse fenômeno ocorre depende do tipo de CFC, do sítio de implantação e da idade do indivíduo receptor, entre outros fatores. Conforme relatado por Ooms (2003), a absorção dos CFC's pode ocorrer de duas maneiras distintas. A primeira seria mediada pelo processo de solução, no qual o implante é dissolvido no meio fisiológico, e a segunda seria mediada por células gigantes

(osteoclastos), que absorveriam o cimento através de fagocitose. Entretanto, os mecanismos exatos e fatores que causam a calcificação no local de implante de CFC's necessitam de maiores investigações.

Os CFC's comportam-se *in vivo* de maneira semelhante às biocerâmicas de β -TCP, são absorvidos formando ao mesmo tempo novo tecido ósseo na interface osso-implante. Os cimentos de fosfato de cálcio reúnem uma série de vantagens que permitem seu uso como preenchimento e substituição de partes danificadas do sistema ósseo dentro as quais estão (ALVES, 2005):

- a) não ser necessário dar forma ao preenchimento;
- b) mínima cavidade do preenchimento;
- c) preparação do cimento é realizada durante o ato cirúrgico;
- d) ótimo contato entre osso e implante;
- e) biocompatibilidade;
- f) bioatividade.

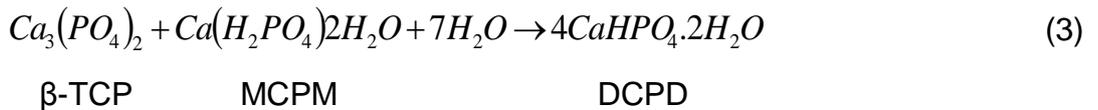
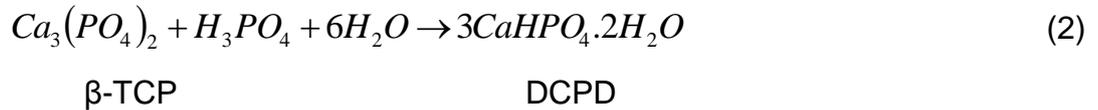
Existem algumas propriedades de interesse clínico que o CFC deve cumprir como (ALBUQUERQUE, 2012):

- a) ausência de toxicidade;
- b) perfeita adesão ao tecido ósseo;
- c) ausência de propriedades alergênicas e cancerígenas;
- d) fácil manipulação;
- e) o pH deve ser neutro durante e após a pega para evitar os efeitos citotóxicos;
- f) dar pega e endurecer *in vivo* em tempos satisfatórios;
- g) resistência mecânica apropriada e permanente;
- h) ser absorvível, condutor e estimulador da formação de novo tecido ósseo.

2.6 Cimento de Hidrogenofosfato de Cálcio Diidratado (DCPD)

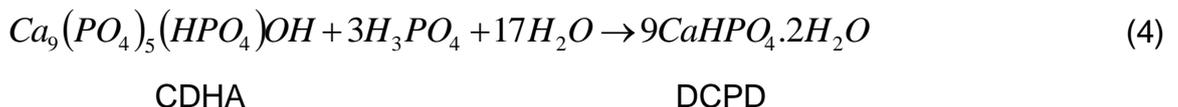
O cimento de hidrogenofosfato de cálcio diidratado, semelhante ao desenvolvido nesta pesquisa a partir do β -fosfato tricálcio (β -TCP) e ácido fosfórico (H_3PO_4), está entre os mais solúveis em condições fisiológicas e, portanto, é mais reabsorvível "*in vivo*" (BOHNER, 2000). Os biocimentos de DCPD são sistemas de três componentes nos quais íons fosfato e água, reagem com um fosfato de cálcio

para formar brushita, conforme as Equações 2 e 3. Segundo Bohner *et al.*, em 1997, o β -fosfato tricálcio (β -TCP) ou dihidrogeno fosfato de cálcio monoidratado (MCPM) reage com ácido fosfórico formando brushita (DCPD) (LEAL, 2006).



Formulações baseadas na reação β -TCP/ H_3PO_4 apresentam vantagens em relação às formulações baseadas em β -TCP/MCPM, tais como, preparação mais fácil e rápida, melhor controle da composição química, propriedades físico-químicas melhores, maior resistência mecânica devido à melhor homogeneidade, sendo que a formulação da equação 3 é composta apenas por pós, dificultando a homogeneização dos reagentes (BOHNER *et al.*, 1997, apud LEAL, 2006).

Segundo Arifuzzaman e Rohani (2004), se a reação da formação do DCPD ocorrer abaixo do pH 6,5, a fase de DCPD é predominante, e acima de 6,5, há a formação de OCP. Por outro lado, em condições fisiológicas DCPD e OCP são termodinamicamente metaestáveis e, por isso, são precursores da HA. Estudos de Barralet *et al.*, em 2004, relataram a hidroxiapatita como um reagente na formação do cimento de DCPD. Os cientistas utilizaram hidroxiapatita nanocristalina precipitada e reagiram com ácido fosfórico formando o cimento, conforme a Equação 4:



As principais limitações do cimento de DCPD para aplicações clínicas são: alta taxa de reabsorção “*in vivo*”, baixa resistência mecânica e caráter ácido, que pode induzir necrose em tecidos (PRADO DA SILVA *et al.*, 2001). Devido a essas limitações, procura-se desenvolver materiais utilizando aditivos na sua

composição. Essa dopagem com aditivos tem sido alvo de um número cada vez maior de estudos investigativos.

2.7 Dióxido de Silício

O dióxido de silício é um material inerte quando interage com os fluídos corpóreos e com os compostos de fosfato de cálcio. É um composto químico encontrado na natureza, também conhecido como sílica, cuja fórmula química é SiO_2 . Pode existir na forma amorfa (sílica vítrea) ou em algum de seus polímeros cristalinos que são o quartzo, tridimita e cristobalita que tem a mesma composição química, porém com arranjos cristalinos diferentes. Os polímeros cristalinos são marcados pela existência de arranjos atômicos ordenados e periódicos.

Nanopartículas de sílica foram utilizadas por Martin *et al.* (2004), para estudar seus efeitos na auto-organização de algumas redes de células. Esse estudo indica que nanopartículas de sílica podem auxiliar na organização e crescimento celular. Em estudos desenvolvidos recentemente, os cimentos são produzidos baseados na combinação de pós de fosfato de cálcio, com pó de silicato de cálcio (HUAN; CHANG, 2009) e (ZHAO *et al.*, 2010) ou de um líquido contendo silicatos (SU *et al.*, 2011). O interesse inicial de dopar o cimento com o silício era melhorar a bioatividade e o potencial osteogênico do material (PATEL *et al.*, 2002; CAMIRÉ *et al.*, 2006; PEITAK *et al.*, 2007; MESTRES; LE VAN; GINEBRA, 2012).

A presença de sílica em materiais biocompatíveis e bioativos, melhora a adesão de células e a proliferação de osteoblastos (KIM *et al.*, 2010). A função principal do silício no osso e no metabolismo da cartilagem é a formação da matriz, que é mais afetada pela deficiência de silício em relação à formação de minerais (AHN *et al.*, 2013). Estudos anteriores utilizaram um elevado teor de sílica, de 25% a 73% em peso, em cimentos de fosfato de cálcio, para avaliar as características do material (PLAN *et al.*, 2003), Ahn e colaboradores (2013), em trabalhos recentes com CFC utilizaram um teor de 5% em peso de sílica que se mostrou satisfatório para avaliar o efeito da sílica no CFC, na proliferação e diferenciação de células ósseas.

Existem alguns estudos no desenvolvimento do cimento ósseo baseado no α -TCP dopado com Si, porém estes não são muito conclusivos (CAMIRÉ *et al.*, 2006; LEROUX; PEREZ-ORDONEZ; VON SCHROEDER, 2007). Camiré *et al.*

(2006) já documentaram o uso de silício no cimento α -TCP sintetizado por reação em estado sólido. A presença do silício melhorou a bioatividade do material e aumentou a atividade dos osteoblastos. Portanto, há uma boa chance de que a incorporação de Si em CFC seja eficaz para melhorar a osteocondutividade deste (LANGSTAFF *et al.*, 2001; CARDENAS *et al.*, 2008). Watanabe *et al.*, em 2006, documentaram que a presença de dióxido de silício em cimentos de α -TCP pode incrementar as propriedades mecânicas do material final.

Alguns trabalhos mostram as melhorias biológicas nos cimentos com a presença de silício, embora o mecanismo pelo qual o silício melhore a bioatividade e a resposta celular de um material seja ainda desconhecido (BOTELHO *et al.*, 2006). Em outros estudos, a incorporação de silício favoreceu o aumento da velocidade de dissolução da hidroxiapatita, tanto "*in vitro*" e "*in vivo*", e também como reforço do processo da remodelação óssea (PORTER *et al.*, 2004; CAMIRÉ *et al.*, 2006). Sabe-se que o silício está envolvido na fase inicial de calcinação óssea, favorecendo o crescimento do tecido ósseo durante os primeiros estágios de formação (PORTER *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2010).

2.8 Testes Biológicos

A avaliação da adequação de um biocimento ou um novo material para aplicações biomédicas é realizada numa tentativa de simular o desempenho do material após sua inserção no corpo humano. Essas avaliações compreendem testes "*in vitro*" e testes "*in vivo*". Para os testes "*in vitro*", são utilizados geralmente estudos em cultura de células e testes de bioatividade em líquido corporal simulado (SBF). Os estudos em cultura de células normalmente compreendem testes de citotoxicidade, medições bioquímicas de atividade celular, avaliação de proliferação, crescimento e morfologia celular.

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993 (1992), o ensaio de citotoxicidade "*in vitro*" é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório.

No teste de citotoxicidade se observa o nível de letalidade do material para as células que define se o material é ou não citotóxico, seguindo normalmente as normas ISO 10993-5, 1992; ASTM, 1992. A avaliação “*in vitro*” possibilita a obtenção de um resultado rápido e de baixo custo (infraestrutura), além de minimizar o uso de animais em pesquisa como a avaliação “*in vivo*” (RIBEIRO, 2003) que hoje em dia é muito discutida e em muitos locais sendo proibida.

Principais vantagens dos testes “*in vitro*” (ARNS, 2004):

- permitem um controle preciso do ambiente físico-químico e das condições fisiológicas, as quais podem ser mantidas relativamente constantes;
- fornece um sistema homogêneo. Após uma ou duas passagens, as linhagens celulares cultivadas assumem uma constituição homogênea ou no mínimo uniforme uma vez que as células são aleatoriamente misturadas em cada transferência e a pressão seletiva das condições do cultivo tende a produzir um cultivo homogêneo do tipo celular mais vigoroso;
- constituem um sistema econômico e ético. Os cultivos podem ser expostos diretamente a um reagente em concentrações mais baixas e bem definidas, o que permite um acesso direto às células.
- são relativamente fáceis de serem mantidos e requerem pouco espaço físico.

Vários métodos “*in vitro*”, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. O cultivo celular compreende um conjunto de técnicas que permite manter as células “*in vitro*” conservando ao máximo suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Dependendo do grau de preservação da estrutura do tecido e do órgão de origem e a sua duração, os cultivos são classificados em diferentes tipos: de órgãos, de tecido, cultivo primário e linhagem celular (ROGERO *et al.*, 2003).

Nos testes “*in vitro*” o material fica direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos e posteriormente são verificadas as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO *et al.*, 2000).

Nos métodos de contato direto, as células são colocadas em contato com o material em teste, sendo normalmente semeadas na forma de uma suspensão

celular sobre o material. Já os métodos de contato indireto podem ser divididos em dois tipos: aqueles em que o material a ser testado é separado das células por uma barreira de difusão (ágar ou agarose) e o segundo tipo no qual substâncias são extraídas do material a ser testado, através de um solvente e colocadas em contato com as células. Nestes testes utilizam-se células de linhagens estabelecidas e fornecidas por revendedores biológicos ou bancos celulares ou de tecidos, como a *American Type Tissue Culture Collection* (ATCC): L-929, a Balb/ 3T3 clone A31; a MRC-5, a WI-38 e outras, devido apresentarem boa reprodutibilidade, eficiência e disponibilidade (ISO 10993-5, 1992).

Outra forma de avaliação “*in vitro*”, para testar a bioatividade dos materiais, envolve a sua exposição por um período de tempo em um meio simulado. A mais comum, é a solução de SBF que é uma solução sintética fisiológica, de composição próxima à do plasma sanguíneo humano e é utilizada para uma avaliação preliminar do comportamento do implante em ambiente corpóreo (LEAL, 2006).

Fazendo um levantamento de alguns fatos da história do SBF, encontramos que em 1990, Abe e seus colaboradores, propuseram o método de recobrimento de materiais bioinertes em solução similar ao líquido corporal simulado com o objetivo de mimetizar o processo de formação de apatitas biológicas (método biomimético). Este método se baseia na precipitação heterogênea de fosfatos de cálcio sobre os substratos de interesse. Com isso, aumenta a osseocondutividade e potencializa o processo de osseointegração do material implantado, melhorando a qualidade da interface osso-implante, principalmente nos períodos iniciais da cicatrização (ALVES-REZENDE *et al.*, 2011).

Em 2002, Barrere e seus colaboradores estudaram várias composições de soluções corpóreas simuladas com o intuito de avaliar a influência dos íons HCO_3^- e NaCl^- no processo de mineralização dos fosfatos de cálcio e notaram que a camada de apatita formada sobre a superfície da liga Ti-6Al-4V variou de acordo com a solução utilizada. No ano seguinte, Oyane e seus colaboradores chamaram a atenção para a possibilidade de precipitação do bicarbonato de sódio (HCO_3^-) nas soluções de SBF em que as concentrações de íons cloro estivessem diminuídas e as de bicarbonato aumentadas. Em estudos de 2004, Takadama e seus colaboradores propuseram, modificação no SBF por meio da diminuição da concentração dos íons Cl^- e HCO_3^- para o nível do plasma sanguíneo humano,

obtendo assim resultados semelhantes ao SBF convencional no que diz respeito à reprodutibilidade e estabilidade da camada de apatita formada.

Em 2006, Kokubo e Tadakama refinaram a fórmula do SBF composta por NaCl, NaHCO₃, KCl, K₃PO₄.3H₂O, MgCl₂.6H₂O, 1.0M HCl, CaCl₂, Na₂SO₄ e Tris (Trisaminometano), com capacidade de formação “in vitro” de camada de apatita sobre materiais metálicos. Com o passar dos anos varias fórmulas foram estuda e testadas com o objetivo de obtenção de soluções cada vez mais próximas das condições biológicas,

Em geral, a capacidade de ligação de um material com o osso é avaliada examinando a capacidade de formação de apatita sobre sua superfície quando imerso em fluido corporal simulado, que contém concentrações iônicas aproximadamente iguais às do plasma sanguíneo humano. Todo material que em solução SBF seja capaz de formar apatita na sua superfície também é capaz de ligar-se ao osso vivo através da camada de apatita formada, desde que o material não contenha qualquer substância que induza reações tóxicas ou de anticorpos (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

2.9 Fisiologia do Osso

O tecido ósseo pode assumir diferentes morfologias e funções, de acordo com sua localização no esqueleto humano. Os ossos são grandes armazenadores de substâncias, sobretudo de íons de cálcio e fosfato (BOYLE *et al.*, 2003). A classificação baseada no critério histológico admite duas variantes de tecido ósseo: osso cortical ou compacto e osso trabecular ou esponjoso (SENA, 2004).

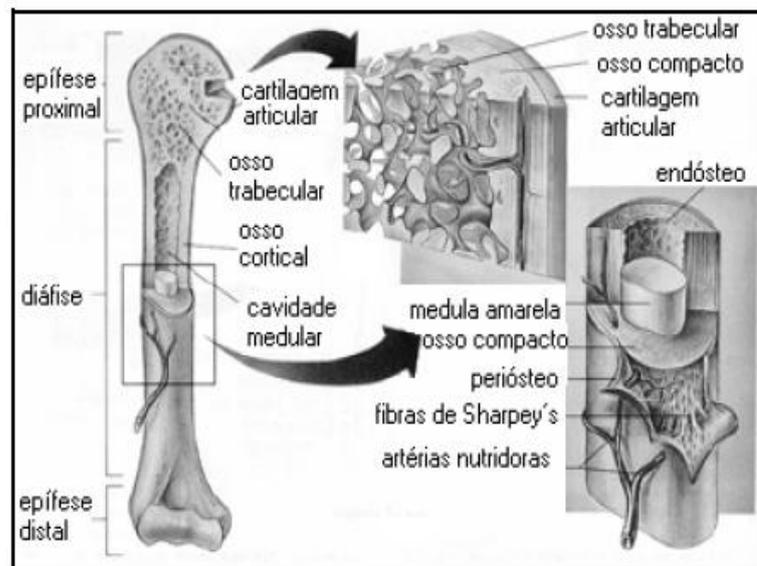
O osso cortical corresponde a cerca de 85% da massa óssea e um terço do volume do esqueleto. Consiste de uma camada compacta e densa que se localiza na região externa dos ossos longos apresentando diversas lamelas intensamente empacotadas (ósteons - unidades de estrutura do osso compacto, formadas por lamelas ósseas) na forma de dutos cilíndricos, dispostos paralelamente ao eixo principal nos ossos longos. É encontrado como revestimento de todos os ossos do organismo possuindo uma camada de espessura variável. Possui baixas porosidade e relação superfície/volume e remodela-se anualmente cerca de 2-3% (SENA, 2004).

O tecido ósseo trabecular não contém ósteons. O osso trabecular corresponde a cerca de 15% da massa óssea e dois terços do volume total do esqueleto. É encontrado principalmente nas epífises dos ossos longos (Figura 3) e nos ossos chatos, sendo revestido por uma camada unicelular chamada endóstio (membrana que reveste a cavidade medular). Este osso possui elevada porosidade e relação área/volume, o que acarreta uma maior atividade metabólica, e remodela-se anualmente cerca de 24% (SENA, 2004).

O tecido ósseo é composto principalmente por (BALSAMO, 2002):

- a) células – osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.
- b) matriz extracelular:
 - parte inorgânica (65%) - hidroxapatita (HA), fosfato tricálcio na forma amorfa, com a presença de íons substituintes tais como: CO_3^{2-} , Mg^{2+} , F^- , Sr^{2+} , etc;
 - parte orgânica (35%) - colágeno tipo I (85-90%) e proteínas não colágenas (10-15%) - como: osteocalcina (grande afinidade com o íon Ca^{2+}); proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's), dentre outras.
- c) substâncias fundamentais – como água e outras.

Figura 3 – Estrutura do osso longo com uma ampliação do osso cortical.



Fonte: LIFE, 2002 apud SENA, 2004.

As células osteoprogenitoras são células que passam por divisão celular para produzir osteoblastos. São importantes no reparo do osso danificado e

localizam-se na camada interna do periósteo (bainha resistente de tecido conjuntivo que reveste a superfície do osso), no revestimento de cavidades medulares e no revestimento de passagens vasculares que se estendem através da matriz extracelular.

Os osteoblastos são responsáveis pela produção da matriz óssea, rica em colágeno (principalmente do tipo I) e essencial para a posterior mineralização, por aderência de cristais de hidroxiapatita, de cálcio, íons magnésio, potássio, sódio e carbonato nas fibrilas de colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os osteócitos são células maduras do tecido ósseo, que derivam dos osteoblastos, mas não têm a função de secretar componentes da matriz como os osteoblastos. Em vez disso, elas mantêm as atividades diárias do tecido ósseo, tais como manutenção e monitoramento da quantidade de proteína, troca de nutrientes e outros (OLIVEIRA, 2008).

Os osteoclastos encontram-se na superfície do osso maduro tendo como função a desmineralização óssea e a digestão da matriz do osso. Essas células usam ácidos como o ácido láctico, que forma um ambiente ácido onde os sais minerais do tecido ósseo são dissolvidos, e enzimas para dissolver a matriz liberando minerais no processo, chamado osteólise (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A matriz extracelular é uma mistura complexa de proteínas estruturais e funcionais, glicoproteínas e proteoglicanas arrançadas numa estrutura tridimensional única e específica. Essas proteínas atuam no fornecimento de suporte e resistência à tração, sítios de adesão para receptores de superfícies celulares e como reservatórios para sinalização de fatores que modulam tais processos, como a angiogênese, a vasculogênese, a migração, proliferação e orientação celular e o reparo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BADYLAK, 2002).

Nos ossos, os componentes inorgânicos são responsáveis pela rigidez e os componentes orgânicos são responsáveis pela elasticidade. A presença de água na fase orgânica de todos os tecidos ósseos promove a proliferação de células ósseas primárias e determina as propriedades mecânicas do tecido ósseo. As composições e propriedades das partes orgânicas e inorgânicas sofrem diferenciação com a idade, sexo, tipo de tecido, dieta alimentar e hábitos saudáveis ou não do indivíduo (RIBEIRO, 2003).

Defeitos ósseos podem ocorrer por diferentes razões, incluindo infecções, doenças, tumores e traumas. A capacidade regenerativa do tecido ósseo é limitada

pelo tamanho da lesão. Assim, defeitos ósseos extensos, provocados por essas razões citadas, não se regeneram espontaneamente, representando um problema na medicina (HERCULIAN *et al.*, 2000).

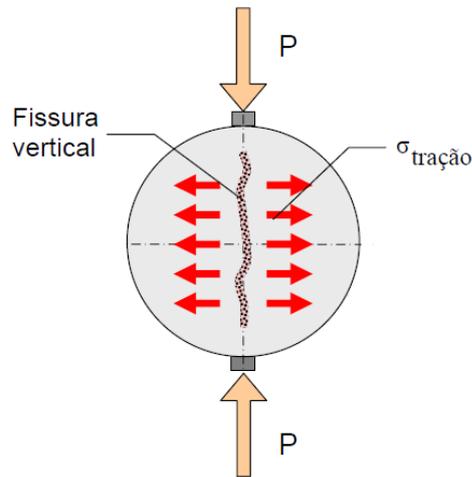
O preenchimento de defeitos ósseos com enxertos autógenos (do próprio paciente) é uma opção de tratamento regenerativo, entretanto tem uma disponibilidade limitada para enxertos, outra desvantagem é a necessidade de duas incisões, uma para retirar o material e outra para preencher o defeito ósseo. Uma outra opção é a utilização de enxerto alógeno (de outro paciente), o que geralmente não é desejável por constituir um possível vetor de doenças. Substitutos adequados, biocompatíveis e bioativos para enxertos são, portanto, requeridos (ALBUQUERQUE, 2004). Um material para ser empregado como substituto ósseo deve ter como características principais: uma baixa toxicidade; boas propriedades mecânicas nas condições fisiológicas; bioatividade e/ou biodegradabilidade (SENA, 2004).

2.10 Resistência à Compressão Diametral

O ensaio de resistência à tração por compressão diametral tem sido usado por diversos autores na caracterização da resistência mecânica dos materiais frágeis (CARRODÉGUAS, 2000). Geralmente os materiais cerâmicos são pouco resistentes em condições de tração direta, pois as trincas microscópicas existentes tendem a se propagar e se orientar perpendicularmente ao eixo de tração. Por outro lado, a maioria das cerâmicas é muito resistente à compressão, uma vez que não rompe por deslizamento (SPIM; SANTOS; GARCIA, 2000).

O ensaio de resistência à tração por compressão diametral conhecido mundialmente como Brazilian Test, foi desenvolvido pelo brasileiro Fernando Lobo Carneiro Barboza em 1968 (GOMIDE, 2005). Os ensaios de resistência à tração por compressão diametral são utilizados com o objetivo de avaliar a tensão de tração máxima suportada por uma amostra, antes da ruptura (SANTANA, 2010; PIORINO NETO, 2000). Também chamado de método indireto, geralmente considera apenas o plano diametral da amostra testada, onde ocorrem mais tensões. O ensaio consiste na aplicação de duas forças diametralmente opostas sobre um corpo de prova cilíndrico, produzindo uma tensão de tração normal ao plano de carregamento, como mostrado na Figura 4.

Figura 4 – Distribuição de tensão e secção transversal em uma amostra submetida a ensaio de compressão diametral.



Fonte: STANLEY, 2001.

No ensaio, ao comprimir um cilindro que está entre duas placas planas, são geradas tensões de tração e compressão, dependendo da posição e direção de observação na amostra. Uma distribuição de carga correta é importante para o teste. A carga aplicada deve ser igualmente distribuída ao longo do comprimento do cilindro. O trincamento ocorrerá na tensão trativa máxima, ao longo do diâmetro carregado. As tensões compressivas máximas ocorrem na superfície da amostra, imediatamente sob as cargas, e aparecerão como trincamento local (ALBUQUERQUE, 2012)

A simplicidade de execução do ensaio e a facilidade de obtenção de amostras densas com geometria cilíndrica tornam atrativa a avaliação da tensão de fratura por meio deste ensaio. Porém, o formalismo matemático para calcular a tensão máxima de fratura requer certas aproximações devido à complexidade do perfil de tensões que atuam no corpo de prova durante o ensaio (PEITL FILHO, 1995).

2.11 Análise de Variância (ANOVA)

A análise de variância (ANOVA) consiste em uma técnica estatística para comparação simultânea de várias médias, provenientes de amostras distintas, é utilizado para aceitar ou rejeitar, estatisticamente, as hipóteses investigadas durante

a realização de experimentos (VIEIRA, 2003). O propósito básico da técnica é comparar uma estimativa do efeito de um tratamento ou amostra com a estimativa do erro aleatório. Considerando-se que o erro aleatório é desprezível, é possível a partir dessa comparação, estabelecer se o efeito do tratamento em questão é ou não significativo. Para isso faz-se uso do teste de hipótese, como o teste F (que é a razão entre o modelo e seu erro) das variâncias amostrais, é um critério que conduz à decisão de se aceitar ou rejeitar a hipótese em consideração, a partir de valores experimentais obtidos das amostras (FREUND; SIMON, 2000). Em outras palavras, o valor de F só diz se houve alguma diferença geral entre as médias, mas não nos diz nada sobre quais pares de grupos possuem médias significativamente diferentes.

Como as conclusões derivadas de testes de hipótese baseiam-se em curvas de distribuição de probabilidades, dois tipos de erros podem ser cometidos, erro do tipo I e erro do tipo II. O erro do tipo I ocorre ao se aceitar a hipótese inicial H_0 quando esta é falsa. A probabilidade de se cometer um erro desse tipo pode ser controlada pela seleção da confiança estatística desejada na realização do teste de hipóteses. Dessa forma, se a confiança escolhida for de 99%, a probabilidade de se aceitar uma hipótese falsa é de 1%, que é igual ao nível de significância do teste, denominado de α (FREUND; SIMON, 2000).

A rejeição de H_0 , quando esta é uma hipótese verdadeira é conhecida como erro do tipo II. A probabilidade de se cometer um erro desse tipo depende do tamanho da amostra, do desvio padrão amostral e da magnitude da diferença entre médias necessária para se aceitar a hipótese nula, segundo a qual as médias são diferentes. Amostras muito pequena podem levar a um erro do tipo II, principalmente quando a diferença observada entre as médias for muito pequena (FREUND; SIMON, 2000).

No método ANOVA, considera-se que qualquer observação aleatória possui três componentes: o efeito comum, o efeito do tratamento e o erro aleatório. O efeito comum é um valor constante presente em todas as observações. O efeito do tratamento consiste de uma parcela fixa ou aleatória, que varia de acordo com a condição experimental considerada. Quanto ao erro, trata-se de uma quantidade aleatória não previsível, cujo valor esperado é zero (VIEIRA, 2008).

O modelo matemático que descreve a origem da variação em cada uma das observações tomadas aleatoriamente de uma população dividida em k tratamentos é dado pela Equação 5.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij} \quad (5)$$

onde:

- Y_{ij} = *i*-ésima observação aleatória do *j*-ésimo tratamento;
- μ = efeito comum ou média da população;
- τ_j = efeito devido ao tratamento *j*;
- ε_{ij} = erro aleatório na *i*-ésima observação do *j*-ésimo tratamento.

Sendo μ_j a média do tratamento *j*, o efeito do tratamento *j* (τ_j) é dado pela diferença entre a média do tratamento *j* e a média da população, de acordo com a Equação 6, e o erro aleatório na *i*-ésima observação do *j*-ésimo tratamento é dado pela diferença entre o valor da observação e a média do tratamento ao qual pertence a observação em questão, conforme Equação 7.

$$\tau_j = \mu_j - \mu \quad (6)$$

$$\varepsilon_j = y_{ij} - \mu_j \quad (7)$$

A Tabela 4 resume as notações e o formato utilizado para organização dos dados necessários à aplicação do método de análise de variância ANOVA (GARCIA DIAZ; PHILLIPS, 1995).

Tabela 4 – Notações e organização dos dados para aplicação do método ANOVA.

	Tratamentos					
	j = 1	j = 2	j = 3	...j	j = m-1	j = m
	Y_{11}	Y_{12}	Y_{13}	Y_{1j}	$Y_{1,m-1}$	Y_{1m}
	Y_{21}	Y_{22}	Y_{23}	Y_{2j}	$Y_{2,m-1}$	Y_{2m}

	$Y_{r_{1,1}}$	$Y_{r_{2,2}}$	$Y_{r_{3,3}}$	$Y_{r_{jj}}$	$Y_{r_{m-1,m-1}}$	$Y_{r_{m,m}}$
Total	T_1	T_2	T_3	T_j	T_{m-1}	T_m
Tamanho da amostra	r_1	r_2	r_3	r_j	r_{m-1}	r_m
Média amostral	\bar{Y}_1	\bar{Y}_2	\bar{Y}_3	\bar{Y}_j	\bar{Y}_{m-1}	\bar{Y}_m

Fonte: GARCIA DIAZ; PHILLIPS, 1995.

Sejam as definições:

$$\text{total geral} = T = \sum_{j=1}^m T_j \quad (8)$$

$$\text{número total de observações} = N = \sum_{j=1}^m r_j \quad (9)$$

$$\text{média total} = \bar{Y} = \frac{T}{N} \quad (10)$$

O desvio total $Y_{ij} - \mu$ (Equação 11) pode ser dividido em duas parcelas: o desvio da média do tratamento j em relação à média total da população, ou seja, τ_j , e o desvio da i -ésima observação do j -ésimo tratamento em relação à média do tratamento correspondente, denominado de ε_{ij} .

$$Y_{ij} - \mu = \tau_j + \varepsilon_{ij} \quad (11)$$

Como os parâmetros populacionais não são conhecidos utilizam-se os valores amostrais estimados de acordo com as definições apresentadas nas Equações (8), (9) e (10) para obtenção do desvio total, que dessa forma pode ser expresso pela Equação 12:

$$Y_{ij} - \bar{Y} = (\bar{Y}_j - \bar{Y}) + (Y_{ij} - \bar{Y}_j) \quad (12)$$

Para levar em consideração apenas a magnitude da variação independentemente do sinal algébrico, calculam-se os quadrados das diferenças, conforme Equação 13.

$$(Y_{ij} - \bar{Y})^2 = (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 + (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 + 2(\bar{Y}_j - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y}_j) \quad (13)$$

Somando-se em i e j , tem-se a Equação 14:

$$\begin{aligned} \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y})^2 &= \sum_j \sum_i (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 + \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 + \\ &+ \sum_j \sum_i 2(\bar{Y}_j - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y}_j) \end{aligned} \quad (14)$$

O último termo da Equação 14 é nulo, como pode ser visto pela Equação 15.

$$\begin{aligned} \sum_j \sum_i (\bar{Y}_j - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y}_j) &= \sum_j (\bar{Y}_j - \bar{Y}) \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y}_j) = \\ &= \sum_j ((\bar{Y}_j - \bar{Y}))(r_j \bar{Y}_j - r_j \bar{Y}_j) = 0 \end{aligned} \quad (15)$$

Definindo-se as seguintes somas de quadrados:

$$SQ_{total} = \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y})^2 \quad (16)$$

$$SQ_{tratamento} = \sum_j \sum_i (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 \quad (17)$$

$$SQ_{erro} = \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 \quad (18)$$

pode-se escrever a equação fundamental da análise de variância, Equação 19.

$$SQ_{total} = SQ_{tratamento} + SQ_{erro} \quad (19)$$

Introduzem-se então três estatísticas adicionais, denominadas de quadrados médios (QM), definidas como o quociente entre cada soma de quadrados e seu respectivo grau de liberdade (GL). O número de graus de liberdade consiste em uma medida da independência dos valores utilizados para determinação de uma estatística.

$$QM_{total} = \frac{SQ_{total}}{N - 1} \quad (20)$$

$$QM_{tratamento} = \frac{SQ_{tratamento}}{m - 1} \quad (21)$$

$$QM_{erro} = \frac{SQ_{erro}}{N - m} \quad (22)$$

O quadrado médio total (QM_{total}) representa a variância total dos dados. O número de graus de liberdade total (GL_{total}) é calculado pelo número total de observações menos um, $N - 1$, em virtude da restrição imposta pelo cálculo da média total (\bar{Y}), que implica a perda de um grau de liberdade.

Da mesma forma, os quadrados médios $QM_{tratamento}$ e QM_{erro} representam estimativas das variâncias entre tratamentos e dentro de cada tratamento, respectivamente, obtidas dividindo-se as somas de quadrados pelos respectivos números de graus de liberdade. Como o objetivo é comparar as variâncias entre tratamentos, o quadrado médio que representa a variação dentro do tratamento ou amostra é chamado de erro experimental (VIEIRA, 2008).

O número de graus de liberdade entre tratamentos, ou entre amostras, é igual ao número de tratamentos menos um ($GL_{tratamentos} = m - 1$) e o número de graus de liberdade dentro de cada tratamento, ou dentro de cada amostra, é igual ao número de tratamentos vezes o número de réplicas por tratamento menos um, ou seja $GL_{erro} = m \times (r - 1)$. O número de graus de liberdade dentro do tratamento ou amostra pode também ser calculado pela diferença entre o número de graus de liberdade total ($GL_{total} = N - 1$) e o número de graus de liberdade entre tratamentos ($GL_{tratamentos} = m - 1$), obtendo-se dessa forma $GL_{erro} = N - m$.

A comparação das variâncias entre tratamentos é feita comparando-se valores de quadrados médios, admitindo-se uma hipótese inicial H_0 de que as médias dos tratamentos ou amostras são diferentes ($H_0 \neq \bar{Y}_1 \neq \bar{Y}_2 \neq \dots \neq \bar{Y}_m$). Se o quadrado médio entre tratamentos apresentar valor bem superior ao quadrado médio dentro dos tratamentos, a hipótese de pesquisa, segundo a qual as médias

comparadas são iguais, poderá ser rejeitada, confirmando-se a hipótese nula H_0 (VIEIRA, 2008).

Essa comparação deverá ser feita com rigor matemático, fundamentando-se na teoria da probabilidade (CARPINETTI, 2000). A estatística utilizada para testar diferenças entre médias é a “estatística F ”, determinada pela razão entre dois quadrados médios ou duas variâncias, conforme Equação 23, na qual v_1 representa o grau de liberdade do quadrado médio 1 (QM_1) e v_2 , o grau de liberdade do quadrado médio 2 (QM_2).

$$F_{v_1, v_2} = \frac{QM_1}{QM_2} \quad (23)$$

O teste F de Snedecor baseia-se na comparação do valor de F calculado a partir dos resultados observados (Equação 24) com valores de F tabelados, obtidos a partir de uma distribuição de probabilidades da razão entre variâncias de duas amostras, extraídas aleatoriamente de uma mesma população com distribuição normal. São tabelados valores de F em função do nível de significância e dos graus de liberdade das variâncias do numerador e do denominador (v_1 e v_2 , respectivamente). O nível de significância α é igual a um menos o nível de confiança adotado. Níveis de significância usualmente aceitos são $\alpha = 0,01$; $0,05$ ou $0,1$, correspondentes a níveis de confiança ou probabilidades de 99% , 95% e 90% , respectivamente (PIRATELLI FILHO, 1997). Dessa forma, o valor de F tabelado é representado na forma F_{α, v_1, v_2} , sendo denominado de valor crítico de F .

$$F_{m-1, N-m} = \frac{QM_{tratamento}}{QM_{erro}} \quad (24)$$

Se o valor de F calculado for maior do que o valor tabelado pode-se afirmar com uma confiança de $[(1 - \alpha) 100]\%$ que as médias são diferentes e portanto aceita-se a hipótese nula.

O resumo dos resultados da análise de variância geralmente mostra-se no formato apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Quadro de análise de variância (ANOVA).

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma de quadrados (SQ)	Quadrado médio (QM)	Razão entre QM (F)
Varição entre tratamentos	$m - 1$	$SQ_{tratamento}$	$QM_{trat} = \frac{SQ_{trat}}{m - 1}$	$F = \frac{QM_{trat}}{QM_{erro}}$
Varição dentro de cada tratamento (erro)	$N - m$ ou $m \times (r - 1)$	SQ_{erro}	$QM_{erro} = \frac{SQ_{erro}}{N - m}$	
Varição total	$N - 1$	SQ_{total}		

Fonte: Adaptado de DOWNING; CLARK, 2000.

Para que os resultados obtidos da análise de variância sejam válidos, é necessário que os dados apresentem distribuição normal e que as variâncias dentro das amostras sejam aproximadamente iguais. Além disso, as variáveis devem ser aleatórias (DOWNING; CLARK, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo apresenta uma descrição da metodologia utilizada na elaboração dos biocimentos desenvolvidos nesta pesquisa.

3.1 Reagentes usados para preparação dos biocimentos

Neste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes:

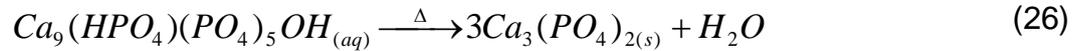
- Hidróxido de cálcio P.A. (Merck) - Ca(OH)_2 , Lote: 38493147;
- Ácido fosfórico (Orto) (Merck) - H_3PO_4 , Lote: K39541273;
- Ácido láctico P.A. (Merck) - $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$, Lote: K40190566;
- Hidróxido de amônio P.A. (Merck) - NH_4OH , Lote: SZBB1600V;
- Dióxido de silício nanométrico (Aldrich) - 10 – 20 nm, Lote: MKBL8542V;
- Água deionizada.

3.2 Obtenção dos pós para a utilização na formulação dos Biocimentos

As apatitas foram produzidas por precipitação em meio aquoso no laboratório de Biomateriais da UFC, utilizando 200 ml das seguintes soluções: 0,6M de Ca(OH)_2 , 0,4M de H_3PO_4 e 1M de $\text{CH}_3\text{CH(OH)COOH}$.

Em um béquer foram adicionadas as soluções de Ca(OH)_2 , $\text{CH}_3\text{CH(OH)COOH}$ e H_3PO_4 , sob agitação constante durante o período de 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado NH_4OH para a precipitação de pós em pH 8. Após a adição de NH_4OH , as suspensões foram envelhecidas durante 24 horas. Ao término do período de envelhecimento, os precipitados foram filtrados, adicionando-se abundantemente água deionizada para a retirada do excesso de NH_4OH .

Os pós filtrados foram secos em estufa a 80°C por 24 horas, em seguida desagregados em almofariz de ágata. No final do processo, os pós foram sinterizados à temperatura de 1200°C durante 1 hora, a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, em forno mufla, obtendo-se o β -TCP conforme as seguintes reações:



Os resultados das caracterizações de difração de raios X, espectroscopia de infravermelho e BET dos pós sintetizados encontram-se no Apêndice A.

3.3 Elaboração dos Biocimentos

Para a preparação dos biocimentos de DCPD/ β -TCP foi determinada uma relação líquido/pó que não comprometesse o comportamento dos biocimentos produzidos. Os parâmetros utilizados foram manuais e visuais, procurando-se obter uma pasta coesa, não muita líquida, para facilitar a moldagem dos corpos de prova (ALBUQUERQUE, 2012). A relação líquido/pó utilizada para este estudo, depois de ter moído para uma melhor homogeneização, foi de 0,45 mL/g.

O aditivo usado neste estudo foi escolhido após uma análise dos aditivos mais empregados na literatura. O dióxido de silício foi escolhido, devido a sua capacidade de melhorar as propriedades biológicas e físicas do material conforme citado na revisão bibliográfica (BOTELHO *et al.*, 2006; PIETAK *et al.*, 2007; CARDENAS *et al.*, 2008). As caracterizações do aditivo encontram-se no Apêndice A.

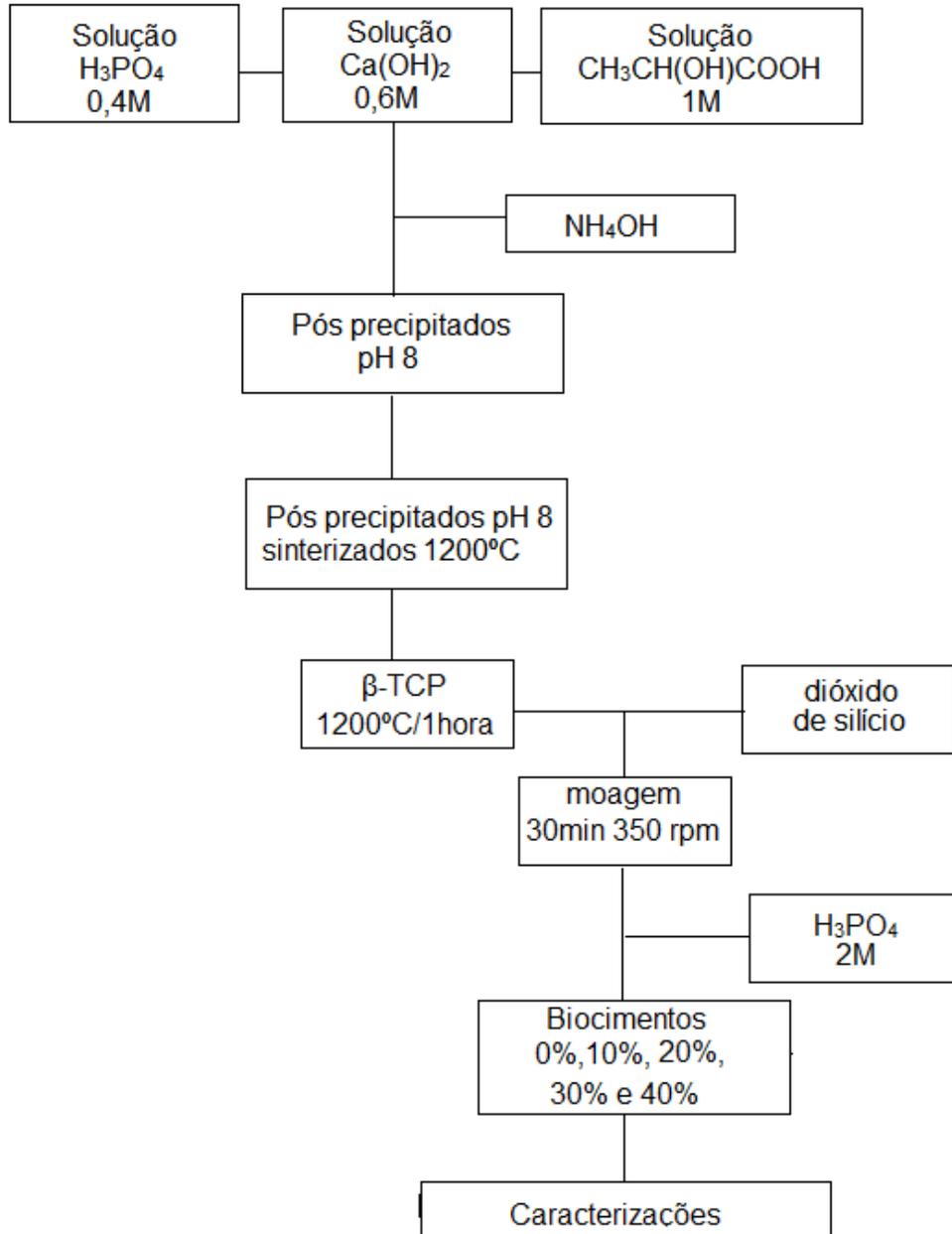
Os biocimentos foram preparados no laboratório de Biomateriais da UFC, com e sem aditivo para avaliar suas propriedades químicas, físicas e biológicas. As concentrações usadas de dióxido de silício foram 10%, 20%, 30% e 40% em peso. A concentração de 40% foi utilizada para as análises de compressão diametral e teste de pH.

Numa jarra de poliacetal, os pós e aditivos foram adicionados. Em seguida realizou-se a homogeneização mecânica num moinho de alta energia da marca Fritsch modelo Pulverisette 6 utilizando esferas de Zircônia, por 30 minutos a 350 rpm. Depois a mistura foi transferida para um becker onde foi adicionado o líquido (solução de ácido fosfórico com concentração 2,0 M).

Após três minutos, a mistura resultante foi transferida para moldes de polímero Teflon[®] em formato de cilindros com 6 mm de altura e 12 mm de diâmetro.

Os corpos-de-prova foram desmoldados após 2 horas e deixados em temperatura ambiente. O fluxograma das etapas de preparação dos biocimentos se encontra na Figura 5.

Figura 5 – Fluxograma das etapas para a obtenção dos biocimentos.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

3.4 Caracterização dos Biocimentos

3.4.1 Difração de Raios X

As amostras foram caracterizadas por difração de raios X em um Difratorômetro de Raios X, marca Rigaku (DMAXB) do Laboratório de Raio X do Departamento de Física da UFC, com tubo cobre operando com voltagem de 40 KV e uma corrente de 40 mA. Para realização das análises os materiais foram colocados na cavidade de um suporte utilizado como porta-amostra. Os difratogramas foram obtidos varrendo a faixa de 5° - 70° para os biocimentos. A difração de raios X foi utilizada para a determinação das fases cristalinas formadas.

3.4.2 Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros de espectroscopia de infravermelho foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Nicolet 800 associado a uma célula MTEch PAS do Laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química da UFC. Os espectros foram obtidos a 4 cm⁻¹ com resolução de uma média de 128 varreduras. A câmara de amostra da célula PAS foi evacuada com gás hélio e seca empregando-se percloroeto de magnésio como agente desumidificante. A técnica possibilita a caracterização dos grupos funcionais característicos presentes nas amostras.

3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise microestrutural foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Philips modelo XL-30 do Laboratório de Caracterização de Materiais do Departamento de Engenharia Metalúrgica da UFC. A amostra foi fixada com fita de carbono dupla face em um suporte e recoberta com uma fina camada de carbono realizada em evaporador de vácuo Bal-Tec. A microscopia permitiu obter dados sobre a morfologia do material.

3.4.4 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

As amostras foram submersas em um Becker contendo água deionizada à temperatura constante de 37°C, com uma relação líquido (água deionizada) /sólido (biocimento) 10:1, no laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da UFC. O pH das amostras foi determinado após 24 horas em um pH-Metro digital marca QUIMIS, modelo Q-400A. Antes de cada medida o pH-Metro foi calibrado com soluções tampão Merck para pH 4 e 7. Foram realizadas (n=7) de cada material para o teste.

3.4.5 Ensaios de Resistência à Compressão Diametral

Para o ensaio de compressão diametral foi utilizado o equipamento universal de ensaios da marca Instron modelo 4443 do Laboratório de Odontologia da UFC. O ensaio foi realizado em cilindros de 6 mm de diâmetro e 12 mm de altura com velocidade de 1 mm/min. Para a determinação dos resultados do ensaio mecânico foi utilizada a equação 27. Foram realizadas (n=7) de cada material para o teste. Os cálculos de resistência à tração por compressão diametral foram feitos segundo a norma da ABNT - NBR 7222/94 (GOMIDE, 2005).

$$\sigma_{tc} = \frac{2P}{\pi \cdot h \cdot d} \quad (27)$$

Onde “ σ_{tc} ” é a tensão limite de resistência à tração (MPa), “P” é a carga de ruptura (N), “d” é o diâmetro da amostra (mm) e “h” a altura do corpo-de-prova (mm).

3.4.6 Testes Biológicos

3.4.6.1 Teste de Citotoxicidade do Biocimento

O estudo de citotoxicidade do biocimento foi realizado no Departamento de Histologia da Universidade de Granada, na Espanha seguindo os seguintes protocolos do laboratório:

a) Preparação dos blocos de biocimento para ensaios de citotoxicidade

Os biocimentos foram seccionados em blocos com tamanho de 0,5 x 0,5 x 0,5 cm. Posteriormente, os materiais foram expostos à radiação ultravioleta para a descontaminação do material.

b) Isolamento e cultura de Fibroblastos de Mucosa Oral Humana (FMOH)

Neste estudo, cultura primária de fibroblastos de mucosa oral humana (FMOH) foi utilizada. Este tipo celular foi previamente usado em estudos de diferentes biomateriais desenhados para regeneração óssea (ZHOU *et al.*, 2013; SAITO *et al.*, 2013). As células foram isoladas e cultivadas de acordo com estudos prévios descritos (SÁNCHEZ-QUEVEDO *et al.*, 2007). Inicialmente, digestão enzimática da matriz extracelular do tecido foi realizada mediante imersão em uma solução de 2% de colagenase tipo I de *Clostridium histolyticum* por 10-12 horas a 37°C. Posteriormente, os FMOH foram coletados por meio de centrifugação, meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich, Germany) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma-Aldrich) e solução de antibióticos/antimicóticos (100 U/mL penicilina G, 100 µg/mL estreptomicina e 0.25 µg /mL anfotericina B (Sigma-Aldrich) foi usado.

As células foram semeadas em meio de cultura DMEM e incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Uma vez atingida a confluência celular de 70-90%, foram realizados subcultivos, mediante o uso de uma solução de 0.5 g/L de tripsina e 0.2 g/L de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich). Posteriormente, ensaios específicos de citotoxicidade foram realizados. Todas as células usadas neste estudo correspondem às três primeiras passagens celulares. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética local em pesquisa da Universidade de Granada, Espanha.

c) Ensaios de citotoxicidade

Para realizar os ensaios de citotoxicidade, 1×10^4 células foram semeadas no compartimento inferior de placas de 24 poços com sistema de insertos. Após 48 horas, o biocimento foi colocado sobre a membrana do sistema de insertos, no compartimento superior, e cobertos por meio de cultura DMEM. FMOH foram expostos ao biocimento durante 1 hora, 12 horas e 24 horas. Células mantidas em meio DMEM correspondiam ao controle. Após os períodos de exposição ao material, os ensaios de proliferação celular mediante o teste WST-1 e viabilidade celular mediante o teste LIVE/DEAD foram realizados. Para ambos os testes, diferentes medições foram realizadas ($n=7$) para cada tempo de exposição.

c.1) Análise de proliferação celular mediante o teste WST-1

Para a avaliação da proliferação celular, o parâmetro de função mitocondrial foi analisado mediante o teste colorimétrico de WST-1 (Roche, Germany). Depois dos períodos de exposição específicos, o sobrenadante foi retirado, as células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS - *phosphate buffered saline*), e incubadas com o reagente WST-1 diluído em meio de cultura na proporção de 1:10, durante 4 horas a 37°C. Absorbâncias foram quantificadas nos comprimentos de onda 450 nm – 690 nm em um leitor de placa UVM 340 (Asys, Cambridge, UK).

c.2) Análise da viabilidade celular mediante o teste LIVE/DEAD

Para a avaliação da viabilidade celular mediante a verificação da atividade de esterase intracelular e da integridade das membranas plasmática e nuclear, foi utilizado o kit comercial LIVE/DEAD (Life Technologies, Carlsbad, CA). O kit contém dois corantes fluorescentes: a calceína para marcar de verde as células vivas, e o homodímero de etídio-1 para marcar de vermelho as células danificadas ou mortas. Depois dos períodos de exposição específicos, o sobrenadante foi retirado, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante 15 min com a solução previamente preparada do kit LIVE/DEAD. Posteriormente, a solução foi retirada e as células observadas em um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 90i,

Nikon, Japan). As imagens foram analisadas pelo programa ImageJ (MacBiophotonics, Ontario, Canada) para quantificar o número de células mortas e vivas como previamente descrito (MARTIN-PIEDRA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

3.4.6.2 Estudo *In Vitro* dos Biocimentos

A avaliação *In Vitro* dos biocimentos, foi realizada no laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da UFC, a avaliação foi feita em solução SBF (líquido corporal simulado). A solução foi preparada no Laboratório de Tecnologia da Biomassa da Embrapa, segundo a metodologia proposta por Bohner e Lemaître (2009), na qual consistiu em preparar previamente duas soluções A e B, usando os reagentes da Tabela 6 (ALVES-REZENDE *et al.*, 2011). O preparo da solução A envolveu todos os reagentes sólidos, com exceção de CaCl_2 , e a metade da solução de HCl prescrita, ao passo que a solução B incorporou CaCl_2 e a outra metade de HCl.

Tabela 6 - Quantidades de reagentes requeridas para o preparo das soluções A e B

Reagentes	Massas (g)	
	Solução A	Solução B
NaCl	6,213	6,213
NaHCO ₃	5,948	
KCl	0,450	
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,462	
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,622	
CaCl ₂		0,584
Na ₂ SO ₄	0,144	
HCl (mL)	0,850	0,850

Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Verificou-se, nas soluções finais A e B, a transparência e ausência de cristais ou precipitados em suspensão, bem como depósitos de precipitado na superfície dos recipientes, tendo em vista que SBF é uma solução supersaturada em

relação à apatita e um método de preparação inapropriado pode levar à sua precipitação durante o ensaio (KOKUBO *et al.*, 1990; OHTUSKI *et al.*, 1991).

A realização do teste de bioatividade seguiu os seguintes passos (KOKUBO E TAKADAMA, 2006):

- (1) Volumes iguais das soluções A e B (ver TABELA 6) foram armazenados separadamente, em tubos falcon, hermeticamente fechados, e acondicionados a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ em incubadora. Foram realizadas (n=7) de cada material para o teste.

O volume necessário de SBF foi calculado através da Equação 28:

$$V_s = S_a/10 \quad (28)$$

Nessa equação, V_s é o volume de SBF (mL) e S_a a área superficial do espécime (mm^2).

- (2) Preparou-se outro tubo falcon com a amostra do biocimento (quadrados de 2 cm de lado) a ser testado.
- (3) Procurou-se injetar simultaneamente o conteúdo das soluções A e B no tubo falcon contendo a amostra do biocimento para, em seguida, colocá-lo na incubadora a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, nos seguintes períodos de tempo: 30 dias, 45 dias, 60 dias e 75 dias.
- (4) A cada período determinado, as amostras foram retiradas, secas em temperatura ambiente por pelo menos 24 horas.

As amostras foram caracterizadas por difração de raios X, para identificar as fases cristalinas presentes e microscopia eletrônica de varredura para obter dados sobre a morfologia de superfície das referidas amostras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor discussão dos resultados foi utilizada a seguinte simbologia.

BIOC00 - Biocimento sem dióxido de silício;

BIOC10 - Biocimento com 10% em peso de dióxido de silício;

BIOC20 - Biocimento com 20% em peso de dióxido de silício;

BIOC30 - Biocimento com 30% em peso de dióxido de silício;

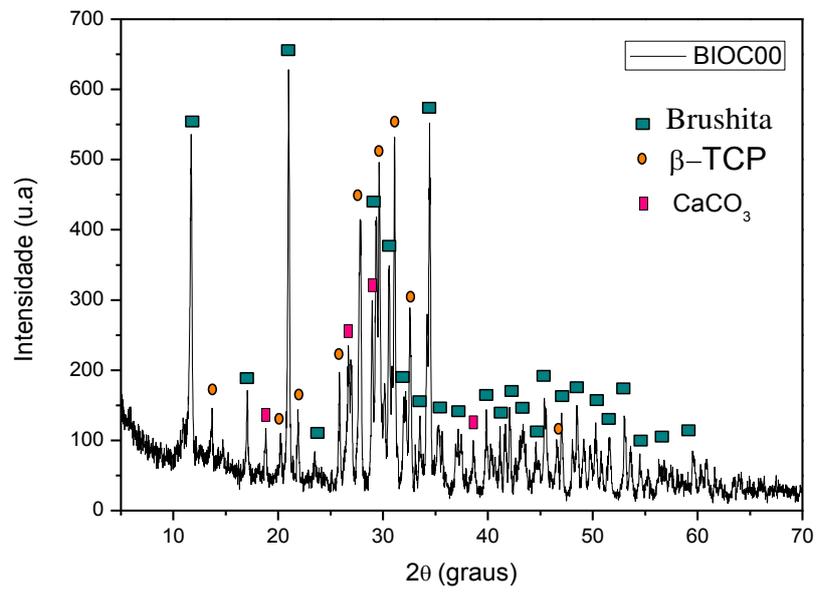
BIOC40 - Biocimento com 40% em peso de dióxido de silício.

Os ensaios de resistência a compressão diametral, ensaios de pH e os testes biológicos - Teste de Citotoxicidade do Biocimento, foram analisados estatisticamente utilizando o teste One-Way Anova (análise de variância), este planejamento experimental tem o objetivo ajudar a determinar os melhores valores de cada análise. O teste One-Way Anova, utiliza o programa Origin[®] 8.

4.1 Difração de Raios X dos Biocimentos

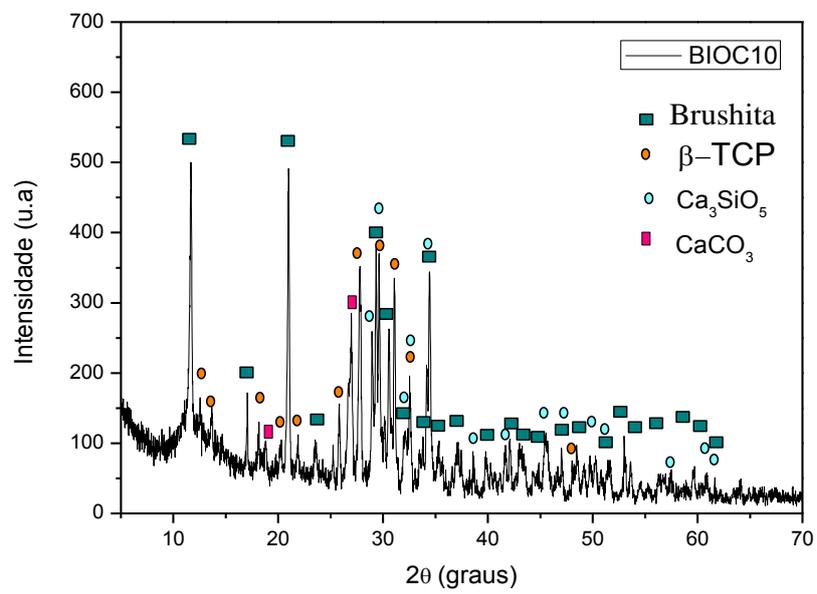
A difração de raios X foi utilizada na identificação das fases presentes em cada biocimento produzido. Para os biocimentos de fosfato tricálcio sem o aditivo (SiO_2) foi possível observar a presença de brushita, beta fosfato tricálcio e carbonato de cálcio (ver Figura 6), a formação do carbonato deve-se provavelmente à reação dos íons Ca^{+2} com carbonato do meio, durante a reação de pega do biocimento. Para os biocimentos de fosfato tricálcio com 10%, 20% e 30% em peso de dióxido de silício, os difratogramas indicaram a presença da brushita (DCPD - ICSD 16132) como fase majoritária, a fase beta fosfato tricálcio (β -TCP - ICSD 6191) e traços de silicato tricálcio (Ca_3SiO_5 - ICDS 201469) conforme as Figuras 7, 8 e 9, sendo que no BIOC10 ainda foi possível observar traços de carbonato de cálcio (Figura 7). O Ca_3SiO_5 quando presente em cimento apresenta adequados tempos de pega inicial e final (5min – 20min), excelente biocompatibilidade e bioatividade o que sugere a possibilidade de uso como material de implante ósseo (WANG *et al.*, 2005 apud ALONSO, 2011).

Figura 6 – Difratoograma de raios X do BIOC00.



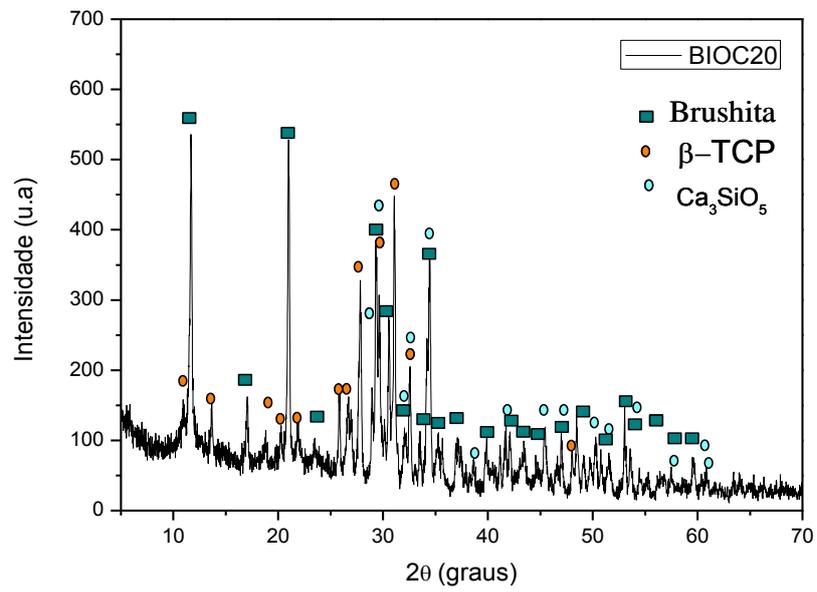
Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Figura 7 – Difratoograma de raios X do BIOC10.



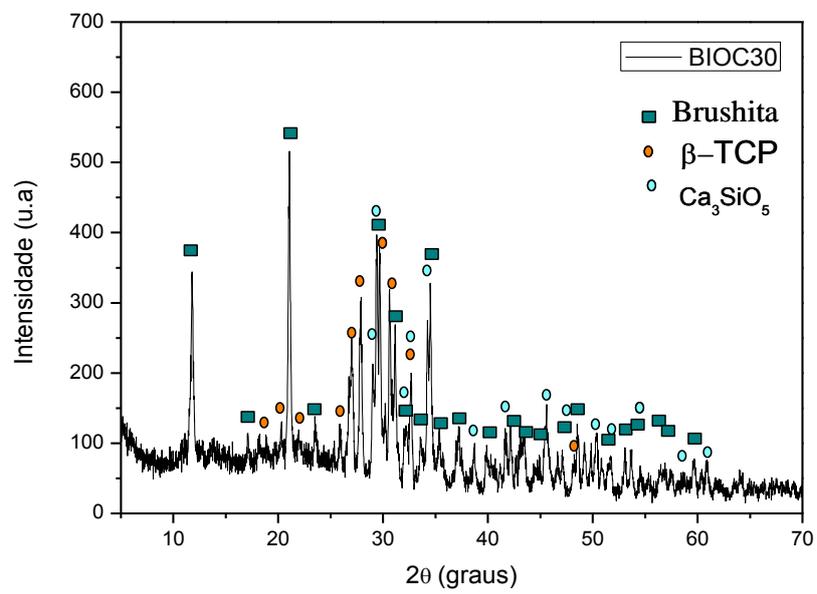
Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Figura 8 – Difratoograma de raios X do BIOC20.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Figura 9 – Difratoograma de raios X do BIOC30.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Nos difratogramas dos biocimentos (BIOC10, BIOC20 e BIOC30) observa-se que, as intensidades dos picos diminuem comparadas ao biocimento sem aditivo (ver Figuras 6 - 9).

Pelo que foi observado o aditivo está interferindo na dissociação do β - TCP para a formação da brushita, e está favorecendo a formação do silicato tricálcio. A presença do silicato tricálcio atua reduzindo também a dissociação do β - TCP, possivelmente pela formação do gel (silicato de cálcio hidratado) na sua superfície, o que prejudica a formação de brushita, fato também citado por Ferreira (2009) e Alonso (2011) que adicionaram o Ca_3SiO_5 em biocimento de alfa fosfato tricálcio. A identificação dos picos do Ca_3SiO_5 é dificultada muitas vezes, devido à sobreposição dos seus picos com os picos dos outros compostos.

A presença da fase β - TCP não é considerada indesejável, pois o β - TCP presente em pequenas quantidades pode vir a favorecer, nos ensaios biológicos. Segundo Alkhraisat (2008) o biocimento brushita tem o processo de degradação muito rápido no líquido corporal, e essa rápida degradação pode resultar na formação do osso imaturo. Esse problema pode ser resolvido através da adição de grânulos β - TCP, que serve como uma âncora para o osso e promove a formação do osso maduro.

É importante também salientar que Albuquerque (2012) explicou a existência da fase β - TCP nos biocimentos de brushita como sendo uma alternativa para se obter uma pasta de biocimento de fácil manipulação e mais resistente. Por isso utiliza-se uma quantidade de ácido ortofosfórico inferior à estequiométrica impedindo que a reação ocorra de maneira completa.

4.2 Espectrogramas de Infravermelho dos Biocimentos.

Por meio da espectrometria de infravermelho foi possível identificar qualitativamente os grupos de fosfato e de dióxido de silício formados nos biocimentos. De um modo geral foram identificados, os grupos funcionais fosfatos, água e carbonatos em todas as amostras. Entretanto a presença do grupo carbonato deve-se possivelmente ao fato de que as sínteses foram realizadas ao ar atmosférico, e não em uma atmosfera inerte, fato também citados por Santos (2002) e Albuquerque (2012) em suas pesquisas.

Nos espectros dos biocimentos, na região situada entre 3700 e 2600 cm^{-1} , são encontradas as bandas vibracionais de 3538 e 3486 cm^{-1} , indicando a presença da molécula H_2O fisicamente adsorvida. Esta presença da água adsorvida também é confirmada na banda em torno de 1650 cm^{-1} . Como foi citado anteriormente também foi possível identificar o grupo carbonato (CO_3^{-2}), através da banda situada aproximadamente em 875 cm^{-1} (OLIVEIRA, 2008) (ver Figuras 10 – 13).

Figura 10 – Espectrograma de infravermelho do BIOC00

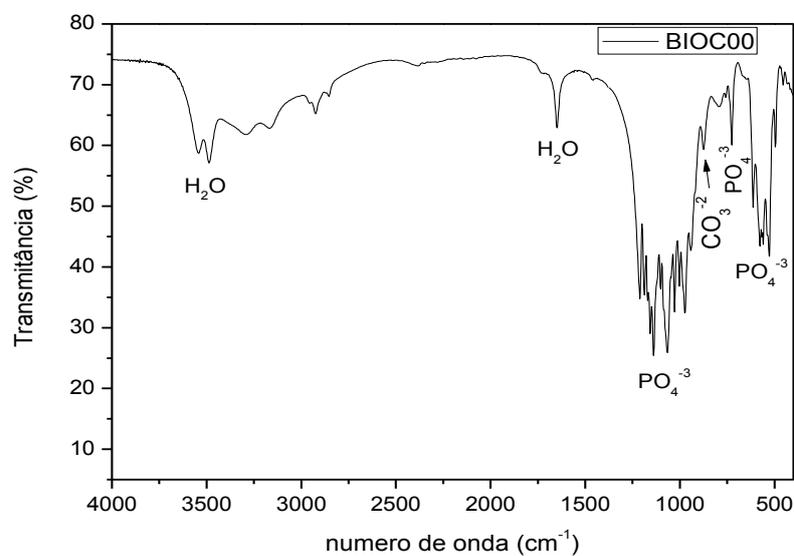
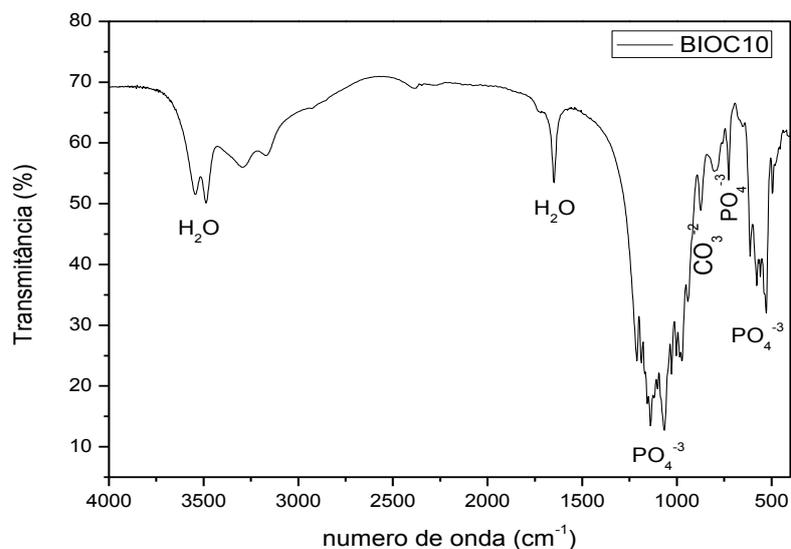


Figura 11 – Espectrograma de infravermelho do BIOC10.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Figura 12 – Espectrograma de infravermelho do BIOC20.

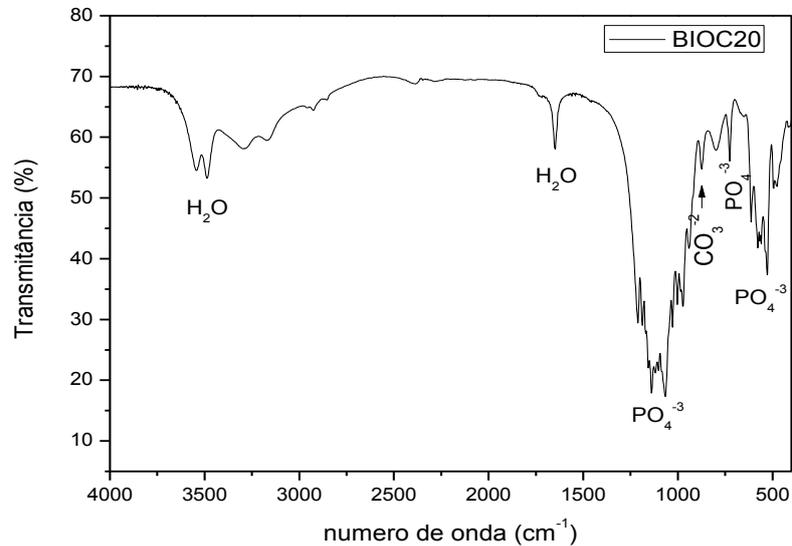
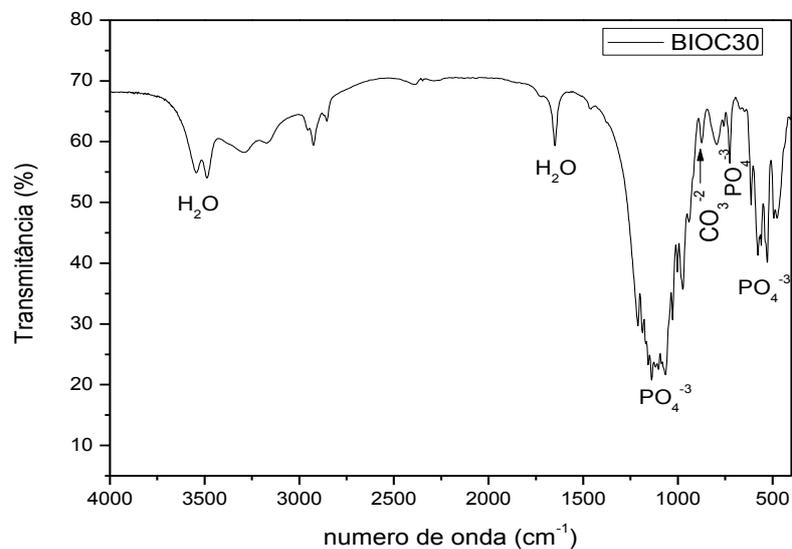


Figura 13 – Espectrograma de infravermelho do BIOC30.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

As bandas vibracionais entre 480 - 1200 cm⁻¹, estão associados ao grupamento fosfato (PO₄⁻³), verifica-se o modo de deformação anti-simétrica dos fosfatos $\nu_4(\text{PO}_4^{-3})$ em 528 cm⁻¹, o estiramento simétrico dos fosfatos $\nu_1(\text{PO}_4^{-3})$ em 980 cm⁻¹. Observou-se também nesta região que as bandas características do dióxido de silício (473 e 1109 cm⁻¹) se sobrepõem às bandas dos fosfatos nos

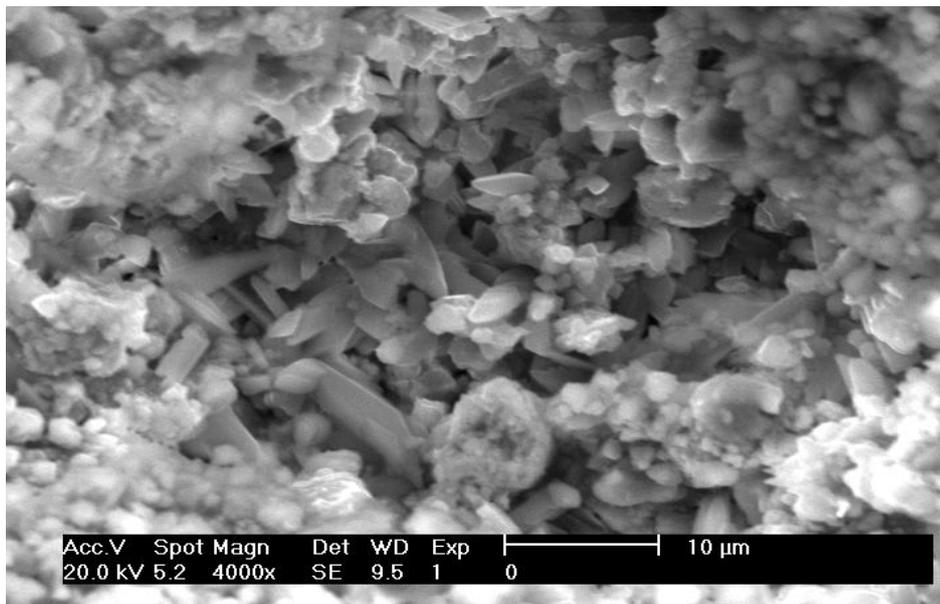
biocimentos, caso observado por outros autores que trabalharam com fosfatos de cálcio e dióxido de silício (SILVA, 2012; BUI, 2011).

Observa-se ainda um pequeno aumento na intensidade dessas bandas formadas, com a incorporação do aditivo (SiO_2), como mostram as Figuras 11 - 13. Nota-se que essas bandas se tornam um pouco mais estreitas com a presença do aditivo. Essas modificações indicam um possível aumento na cristalinidade desses materiais (SILVA, 2012).

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.

Os estudos de caracterização por microscopia eletrônica de varredura, para as diferentes composições de biocimentos, mostraram uma morfologia formada por cristais de diferentes formas, conforme ilustrado nas Figuras 14 - 17.

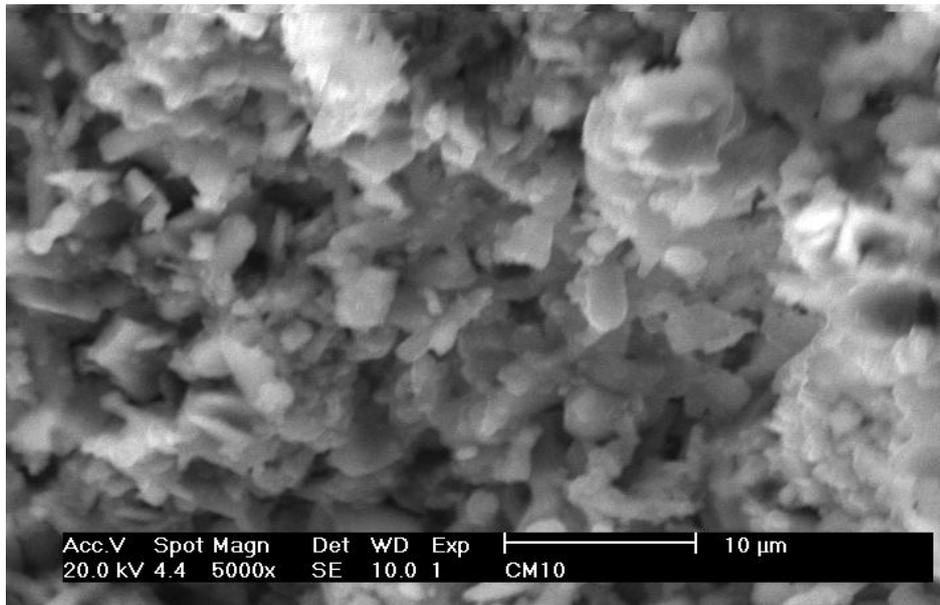
Figura 14 – Morfologia referente ao BIOC00.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

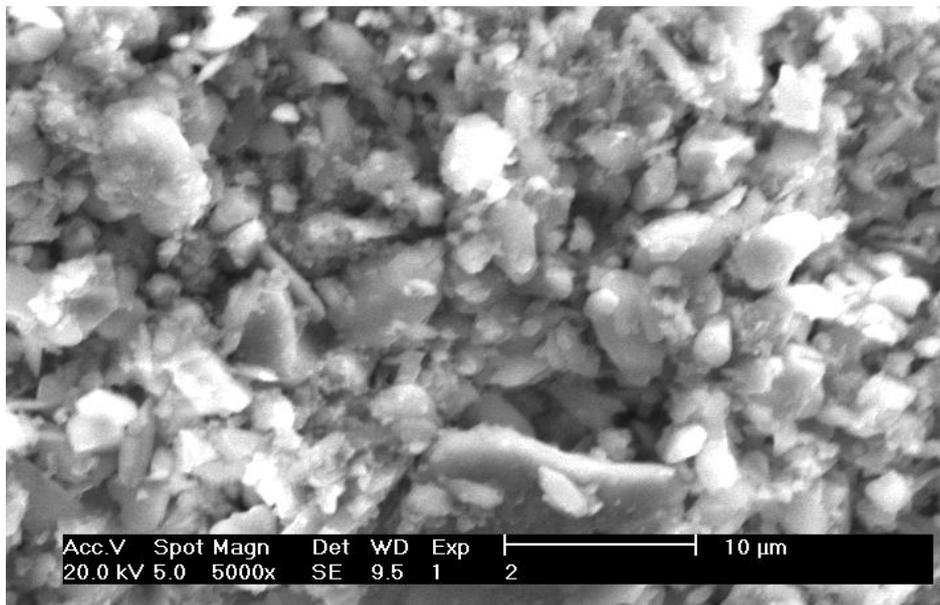
O BIOC00 apresenta uma morfologia formada por cristais de DCPD em forma de placas envolvidas, provavelmente por partículas aglomeradas de β - TCP, de acordo com a Figura 14. Leal (2006) e Albuquerque (2012) em seus trabalhos apresentaram uma morfologia semelhante.

Figura 15 – Morfologia referente ao BIOC10.



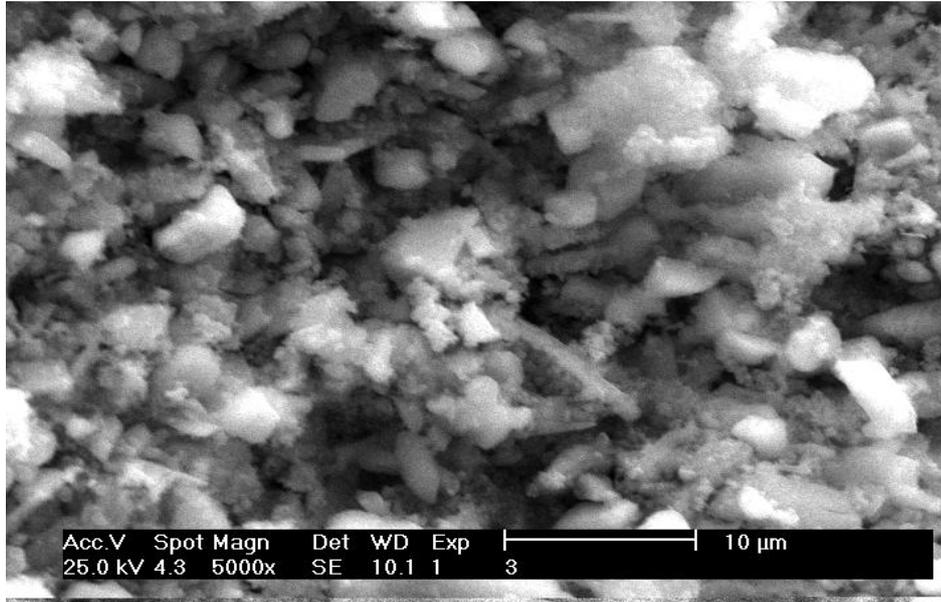
Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Figura 16 – Morfologia referente ao BIOC20.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Figura 17 – Morfologia referente ao BIOC30.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Nas Figuras 15 - 17 pode-se observar que as incorporações do aditivo nas amostras ocorrem muitos aglomerados provavelmente de dióxido de silício junto com o β -TCP, um problema típico de pós nanométricos com alta reatividade, devido o tamanho da partícula (ver Apêndice A).

Nota-se que à medida que é aumentada a porcentagem de aditivo aumenta o aglomerado de β -TCP/ SiO_2 dificultando o crescimento de cristais de brushita (como explicado na difração de raios X), favorecendo possivelmente a formação de cristais menores (favorável a adesão celular), que poderiam melhorar a resistência mecânica dos biocimentos, pois os cristais menores preencher os espaços vazios. A literatura relata que a resistência mecânica dos biocimentos de brushita melhora diminuindo os espaços vazios existentes nas amostras (GROVER *et al.*, 2005).

4.4 Ensaio de Compressão Diametral

A Tabela 7 apresenta a média dos valores dos ensaios de compressão diametral das amostras de biocimentos. Observa-se que o dióxido de silício, favorece o aumento da resistência mecânica dos biocimentos. Para se conferir essa tendência, foram produzidos biocimentos com 40% em peso de dióxido de silício. Os resultados da resistência à compressão diametral, no entanto, mostraram uma

queda acentuada na resistência acima de 30% em peso de dióxido de silício. Mais dependendo da finalidade do biocimento, esse resultado pode contribuir ou não.

Tabela 7 – Resultados de resistência à compressão diametral

Biocimentos (%)	Média da Resistência (MPa)	Desvio Padrão (MPa)
0	0,75333	0,0813
10	1,18533	0,0485
20	1,36433	0,0384
30	1,41233	0,01242
40	0,805	0,06643

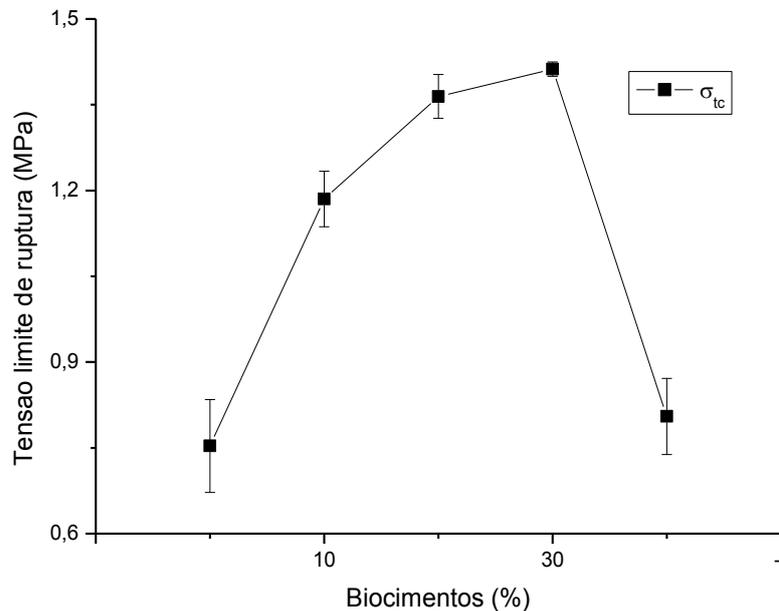
Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Utilizando os dados da Tabela 7 foi plotado o gráfico da Figura 18, que evidencia essa tendência de queda na resistência mecânica.

De acordo com o resultado de compressão diametral foi observado que o dióxido de silício contribui para o aumento da resistência até a porcentagem de 30%, mas por ser altamente reativo e por possuir uma alta área superficial (Tabela 12 – Apêndice A), suas nanopartículas tendem a formar aglomerados (β -TCP/SiO₂) em razão da força de ligação entre elas.

Conforme Ishikawa e colaboradores (2002) e Nakagawa e colaboradores (2007) para conseguir um reforço nas propriedades mecânicas dos CFC's, o aditivo deve se entrelaçar à apatita formada durante a reação de pega, caso contrário os aditivos podem favorecer a formação de poros e diminuir as propriedades mecânicas. Outra forma citada na literatura para aumentar a resistência dos CFC's, é deixar o CFC produzido em contato com o líquido corporal simulado, pois o líquido favorece o crescimento e o entrelaçamento dos cristais produzidos, aumentando a resistência (SANTOS, 2002; ALONSO, 2011).

Figura 18 – Ensaio de resistência à compressão diametral



Fonte: PRÓPRIO AUTOR

TESTE DE ANOVA

Os resultados dos testes de compressão diametral foram submetidos à análise de variância com nível de significância (α) de 5%, com o objetivo de averiguar estatisticamente se a variação dos resultados é diferente para que se conclua que as médias aritméticas das resistências não são todas iguais, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8 – Análise de Variância da resistência à compressão diametral

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p -valor
Aditivo	1,14548	5	0,2291	68,70885	6,80333E-7
Resíduo	0,03001	9	0,00333		
Total	1,17549	14			

Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

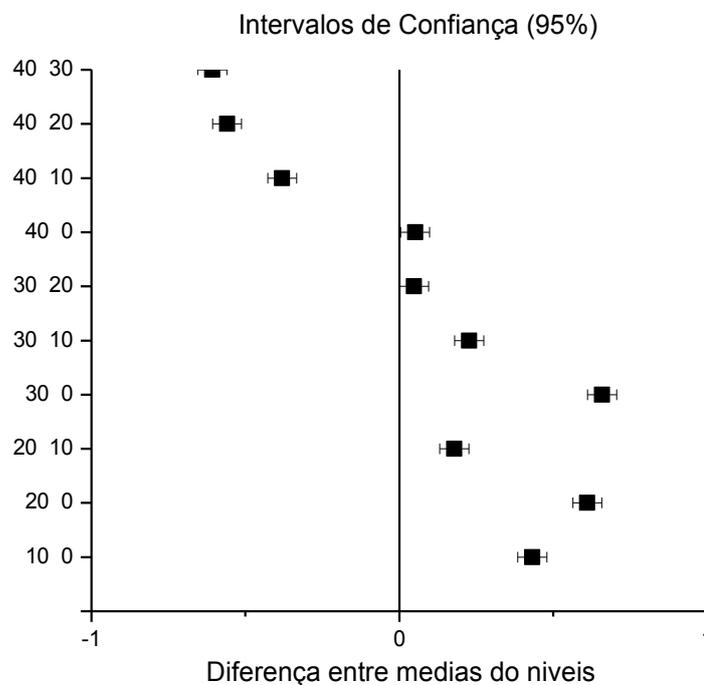
Ao realizar a análise de variância observa-se que o dióxido de silício influencia de maneira significativa as propriedades mecânicas dos biocimentos para

um nível de confiança de 5%. Assim a probabilidade de obter uma estatística F igual ou superior a 68,70885 para a média aritmética das resistências, quando a hipótese nula é verdadeira, corresponde a 6,80333E-7. Neste caso, como o p-valor é menor do que o α especificado rejeita-se a hipótese nula de igualdade das médias, ou seja, pode-se dizer que existe diferença estatisticamente significativa na média aritmética das resistências à compressão diametral dos biocimentos.

TESTE DE TUKEY-KRAMER

Como o teste ANOVA demonstrou haver diferenças entre os níveis, o método de comparações múltiplas de Tukey (que avalia a igualdade entre os níveis) foi empregado para determinar quais níveis apresentam diferenças estatisticamente significativas. Uma forma de se avaliar se existe ou não igualdade entre os níveis é observando os intervalos de confiança na Figura 19, se o valor “zero”, pertencer ao intervalo não se rejeita a hipótese de igualdade entre os níveis.

Figura 19 – Teste de Tukey-Kramer do ensaio de compressão



Fonte: PRÓPRIO AUTOR

Desta forma, vê-se que existem diferenças significativas entre quase todos os pares de média, e não se rejeita a hipótese de igualdade entre 0 – 40 e 20 - 30. Isso implica que entre 0 e 40% , 20% e 30% produzem aproximadamente, a mesma resistência á compressão diametral e que todos os outros níveis testados de concentração produzem resistências diferentes.

4.5 Teste de pH

Os resultados do teste de pH das amostras de biocimentos estão apresentados na Tabela 9, observa-se que a faixa de pH encontrado esta entre 6,0 a 6,5. Para esta análise também se optou pela produção do biocimento com 40% de aditivo (BIOC40), para observar como seria seu comportamento.

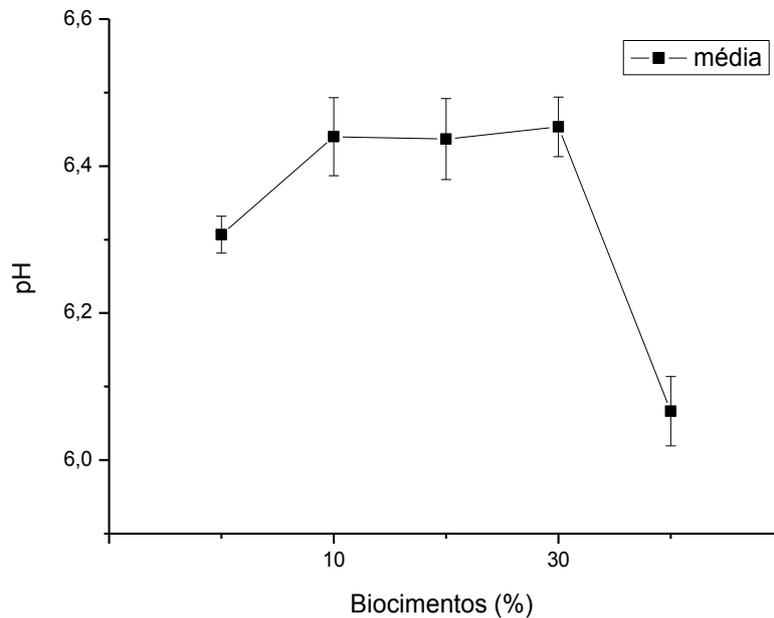
Tabela 9 – Planilha dos resultados dos ensaios de pH dos biocimentos.

Biocimentos	Média dos resultados	Desvio Padrão
0	6,30667	0,02517
10	6,440	0,05292
20	6,43667	0,05508
30	6,45333	0,04041
40	6,06667	0,04726

Fonte: PRÓPRIO AUTOR

A partir dos resultados do ensaio de pH, foi possível traçar um gráfico, apresentado na Figura 20 que mostra o efeito do aditivo nos biocimentos após 24 horas de imersão em água destilada a uma temperatura de 37°C. Segundo Driessens e colaboradores (1997), são considerados adequados para implantação, materiais com pH na faixa entre 6,5 a 8,5. Existe um controle rígido do pH de novos materiais, pois sua variação pode desencadear uma série de problemas (morte celular) no local de enxerto, e no corpo humano. Desse modo as amostras BIOC10, BIOC20 e BIOC30 podem ser utilizadas para implantes ósseos, menos o BIOC00 e BIOC40.

Figura 20 – Ensaio de pH dos biocimentos



Fonte: PRÓPRIO AUTOR

TESTE DE ANOVA

Os resultados do ensaio de pH foram submetidos à análise de variância com nível de significância (α) de 5%, com o objetivo de averiguar estatisticamente se a variação dos resultados é diferente para que se conclua que as médias aritméticas dos pH não são todas iguais, como mostra a Tabela 10.

Tabela 10 – Análise de Variância do pH dos biocimentos

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Aditivo	0,32403	4	0,08101	39,19677	4,41651E-6
Resíduo	0,02067	10	0,00207		
Total	0,34469	14			

Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

A partir da tabela 10 tem-se que o p-valor é igual a 4,41651E-6, menor que o nível de confiança de 0,05, portanto rejeita-se a hipótese nula de igualdade das médias, pois existe uma diferença na média aritmética do pH para os níveis.

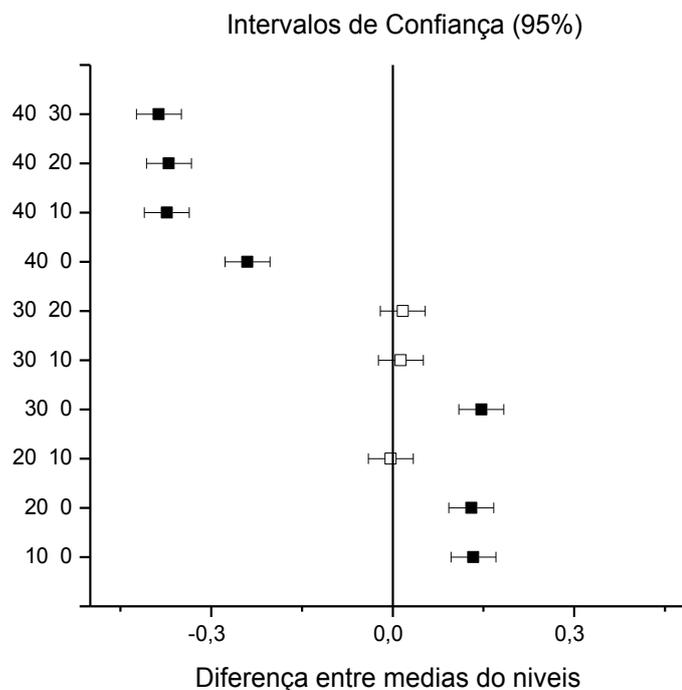
Com base nestes resultados foi realizado o procedimento de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

TESTE DE TUKEY-KRAMER

Como existe diferença na média aritmética do pH para os níveis, o método de comparações múltiplas de Tukey foi empregado para determinar quais níveis apresentam diferenças estatisticamente significativas. A avaliação foi feita observando os intervalos de confiança na Figura 21, se o valor “zero”, pertencer ao intervalo não rejeitamos a hipótese de igualdade entre os níveis.

Desta forma, observa-se que existem diferenças significativas entre os pares de média 40 – 30, 40 – 20, 40 – 10, 40 – 0, 30 – 0, 20 – 0 e 10 – 0, exceto entre os pares 30 – 20, 30 – 10 e 20 – 10, onde não se rejeita a hipótese de igualdade. Isso implica que, os biocimento com 30% e 20% de aditivo, com 30% e 10% de aditivo e com 20% e 10% de aditivo apresentam aproximadamente o mesmo pH, enquanto os outros níveis de concentração produzem pH diferentes.

Figura 21 – Teste de Tukey-Kramer do ensaio de pH



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

4.6 Testes Biológicos

4.6.1 Teste de Citotoxicidade do Biocimento

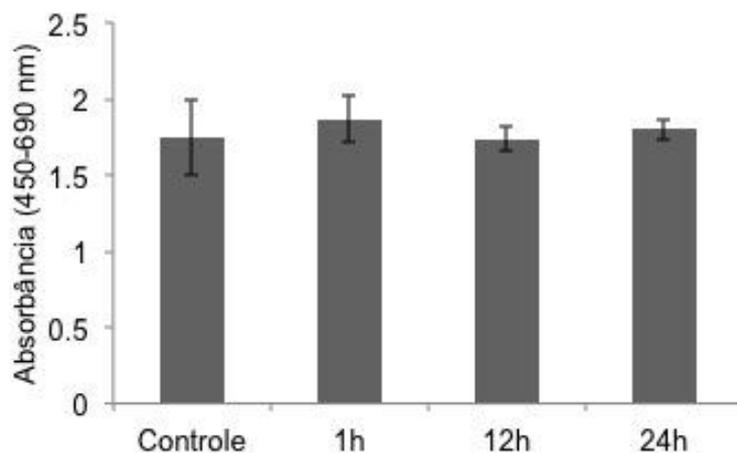
Cultivos Celulares de FMOH (Fibroblastos de Mucosa Oral Humana)

FMOH foram eficientemente isolados de acordo com métodos previamente descritos. As células cultivadas exibiram um citoplasma alongado e um núcleo central.

Análise de Proliferação Celular Mediante o Teste WST-1

A análise da proliferação celular determinada pelo teste WST-1 mostrou que houve uma diminuição estatisticamente significativa da atividade metabólica celular ao aumentar o tempo de exposição de 1 hora para 12 horas ($p < 0,05$). Contudo, a proliferação celular de todos os grupos foi semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$), comprovando que a exposição das células ao biocimento, durante os períodos avaliados, não produziu alterações importantes no metabolismo das enzimas mitocondriais (Tabela 11), a Figura 22 mostra o resultado das absorvâncias dos biocimentos.

Figura 22 – Resultados da quantificação das médias das absorvâncias referentes aos diferentes períodos de exposição.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Tabela 11 – Análise de variância ANOVA para comparação global entre os grupos experimentais^a. Teste de Levene para análise de variância (ANOVA)^b. Teste de Tukey da diferença significativa entre pares de grupos experimentais^c. Todos os testes estatísticos foram realizados para cada ensaio.

	<i>WST-1</i>		<i>LIVE/DEAD</i> TM	
Levene	0,19483		0,827	
ANOVA	0,0035		0,0111	
Tukey	valor <i>p</i>	<i>Sig</i>	valor <i>p</i>	<i>Sig</i>
1h <i>versus</i> controle	0,05786	0	0,12363	0
12h <i>versus</i> controle	0,47175	0	0,02976	1
12h <i>versus</i> 1h	0,00188	1	0,90155	0
24h <i>versus</i> controle	0,99689	0	0,01205	1
24h <i>versus</i> 1h	0,08801	0	0,70479	0
24h <i>versus</i> 12h	0,35968	0	0,97873	0

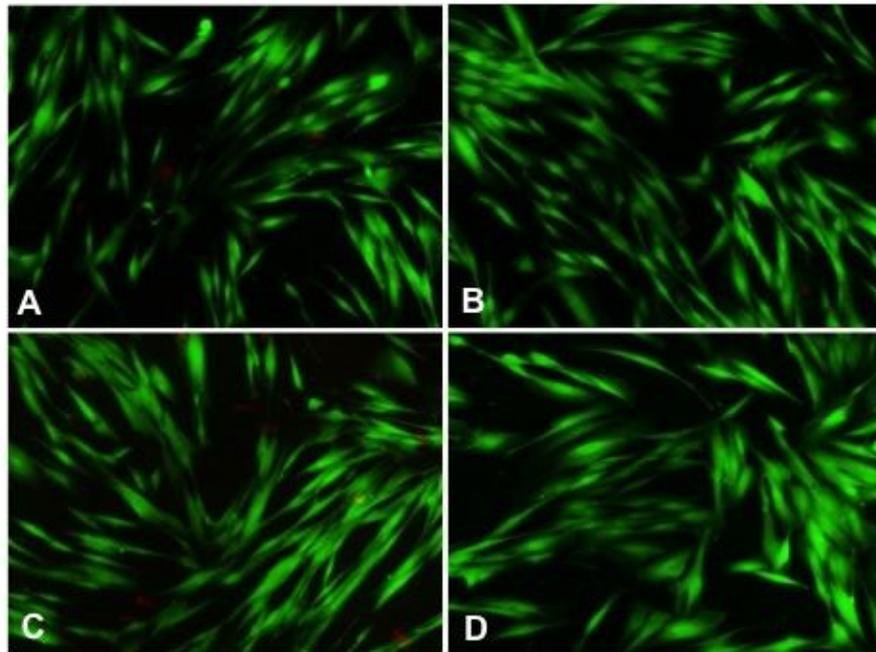
^a Os valores *p* são mostrados para cada ensaio. ^b Os valores *p* são mostrados para cada ensaio. ^c Os valores *p* e *Sig* são mostrados para cada ensaio.

Os resultados indicam que o biocimento não causou modificações expressivas na proliferação celular de FMOH. Contudo, um estudo direcionado à regeneração óssea em fendas palatinas, foi evidenciado que células-tronco mesenquimais humanas (hMSC), quando semeadas sobre matrizes 3D de tricálcio fosfato e polihidroxibutirato (TCP-PBH) confeccionadas por prototipagem rápida, apresentaram proliferação celular aumentada, mediante os ensaios LIVE/DEAD e WST-1, e capacidade de diferenciação osteogênica (BERGER et al., 2015). Klammert e seus colaboradores (2009) comprovaram que matrizes de brushita apresentaram melhores resultados de proliferação e viabilidade de células osteoblásticas, mediante o teste WST-1, quando comparadas com matrizes de monetita.

Análise da Viabilidade Celular Mediante o Teste LIVE/DEAD

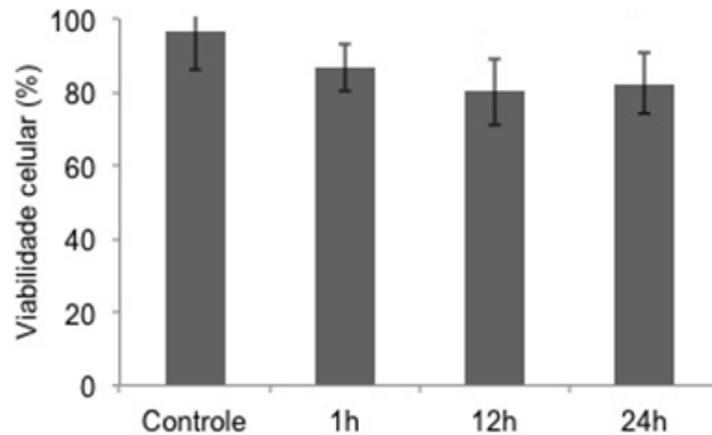
A análise da viabilidade celular realizada com o teste LIVE/DEAD demonstrou uma redução significativa do percentual de células viáveis e funcionais ao ampliar o tempo de exposição para 12 horas e 24 horas quando comparados com o controle ($p < 0,05$) (Tabela 11). No entanto, a viabilidade celular avaliada neste teste foi superior a 80% em todos os tempos de exposição. Esse resultado evidencia que apesar da exposição das células ao biocimento, por tempos mais longos, ter gerado diferenças significativas, os valores em geral se mantiveram elevados (Figuras 23 e 24), preservando esse parâmetro em níveis aceitáveis.

Figura 23 – Imagens representativas de FMOH expostos ao biocimento e analisados pelo teste LIVE/DEAD™. Células verdes correspondem a células vivas e as células vermelhas representam as mortas. Imagens correspondentes aos períodos de exposição de 1 hora (A), 12horas (B), 24horas (C) e controle (D).



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Figura 24 – Resultados da quantificação do número de células vivas em porcentagem referentes aos diferentes períodos de exposição.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Em um estudo direcionado à regeneração óssea, Frantzén e seus colaboradores (2011) comprovaram que compósitos a base de poli-70L/30DL-lactato (PLA70)/ β -TCP, quando cultivados com células-tronco derivadas de tecido adiposo humano e ovino, propiciaram viabilidade celular apropriada em todos os tempos avaliados (7, 14 e 28 dias), através do teste LIVE/DEAD. Recentemente, Buizer e seus colaboradores (2014) demonstraram que matrizes de β -TCP de baixa (45%) e alta (90%) porosidades ao serem semeadas com células-tronco da medula óssea, pelo método de cultivo a vácuo ou estático, possibilitaram uma viabilidade celular superior a 70% em todos os grupos, mediante a análise pelo teste de LIVE/DEAD. Dahabreh e seus colaboradores (2014) compararam sete substitutos ósseos com relação à biocompatibilidade e às propriedades osteogênicas, e evidenciaram que após 21 dias de cultivo de células osteoprogenitoras sobre os materiais, o β -TCP foi capaz de conservar melhor a viabilidade celular, mediante o ensaio de LIVE/DEAD, bem como permitiu a proliferação e diferenciação celular. Além disso, Alge e seus colaboradores (2011) demonstraram que células progenitoras mesenquimais expostas a cimentos de brushita, preparados a partir das composições 2:1 MCPM:HA e 1:2 MCPM: β -TCP, apresentam citocompatibilidade superior a 70%, e o material 1:2 MCPM: β -TCP mostrou melhores resultados, mediante os ensaios de citometria com anexina V conjugada ao isotiocianato/iodeto de propídio.

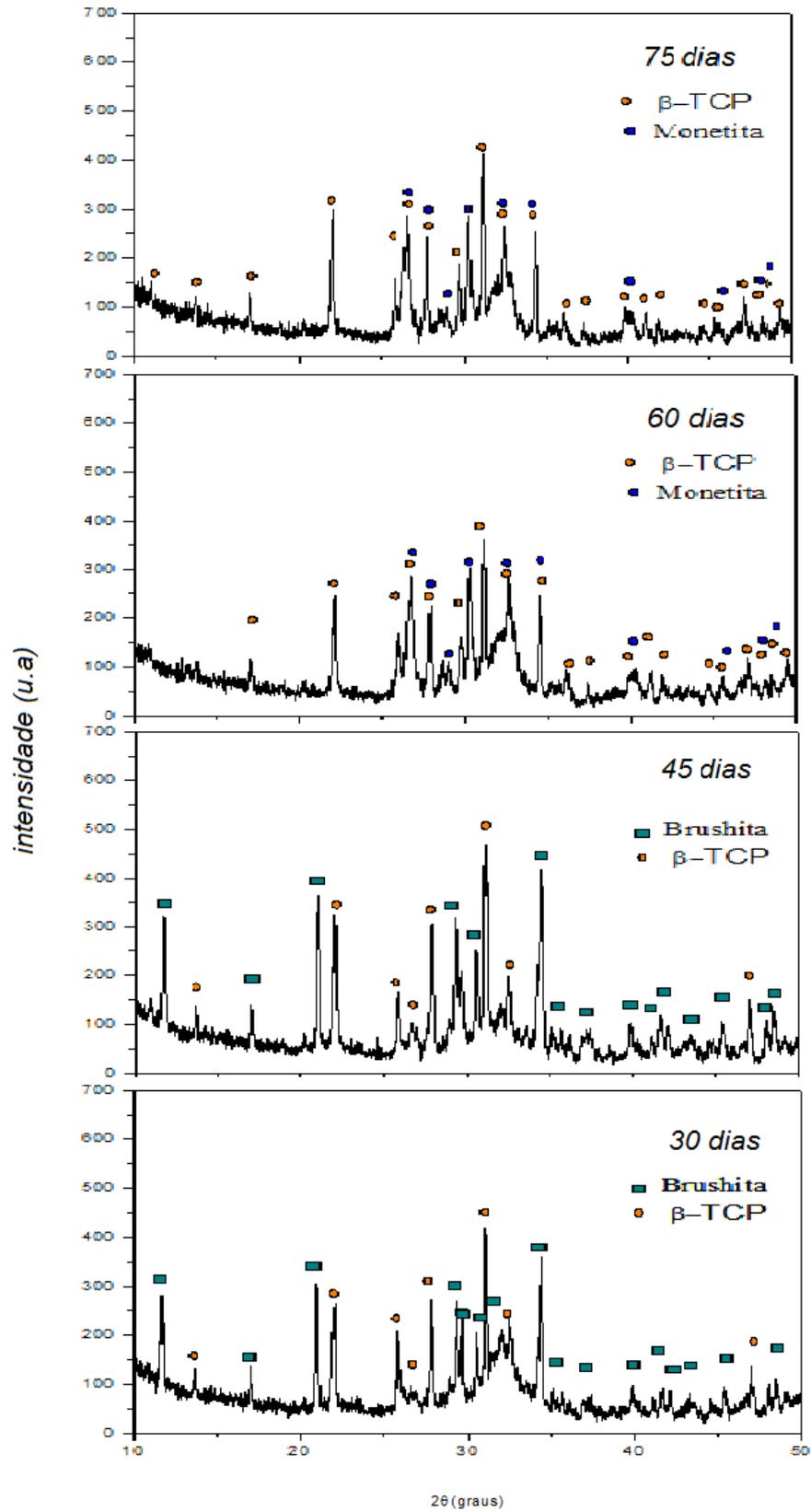
4.6.2 Estudo *In Vitro* dos Biocimentos

As análises de difração de Raios X dos biocimentos após a imersão em SBF mostraram que não ocorreram alterações nas composições dos biocimentos com 30 e 45 dias sendo considerado um bom indicativo da estabilidade do material em estudo, segundo Leal (2006) que também trabalhou com alguns biocimentos de fosfato de cálcio, ao realizar os testes em solução SBF, seus biocimentos também não sofrem alterações quanto à sua composição quando em contato com a solução que simula os fluídos corpóreos. Entretanto com 60 e 75 dias, os biocimentos sofreram alterações em sua composição: foi possível identificar a formação de uma nova fase - a Monetita (DCPA – ICSD 030423) e observar que ocorre a sobreposição dos seus picos com alguns picos do beta fosfato tricálcio presente (Ver Figura 25).

Também foi possível observar que as intensidades dos picos diminuíram com os tempos de 60 e 75 dias, e um possível alargamento dos picos, caracterizando que a nova fase é amorfa. Segundo Ribeiro (2003) a fase depositada sobre a superfície do material, na formação "*in vitro*", é inicialmente amorfa.

Observar-se que a fase brushita não está presente nos difratogramas das amostras que permanecem em contato com a solução SBF, durante os tempos de 60 e 75 dias. Esse fato ocorre devido à brushita ser mais solúvel em condições fisiológicas (BOHNER, 2000), ou seja, o biocimento brushita tem um processo de degradação muito rápido no líquido corporal (ALKHRAISAT, 2008), formando assim seus precursores ou transformando em outro fosfato de cálcio mais estável (KLEIN; WOLKE; DE GROOT, 1993), como se pode observar na Figura 25.

Figura 25 – Difratoogramas de raios X do biocimento do teste *in vitro*.

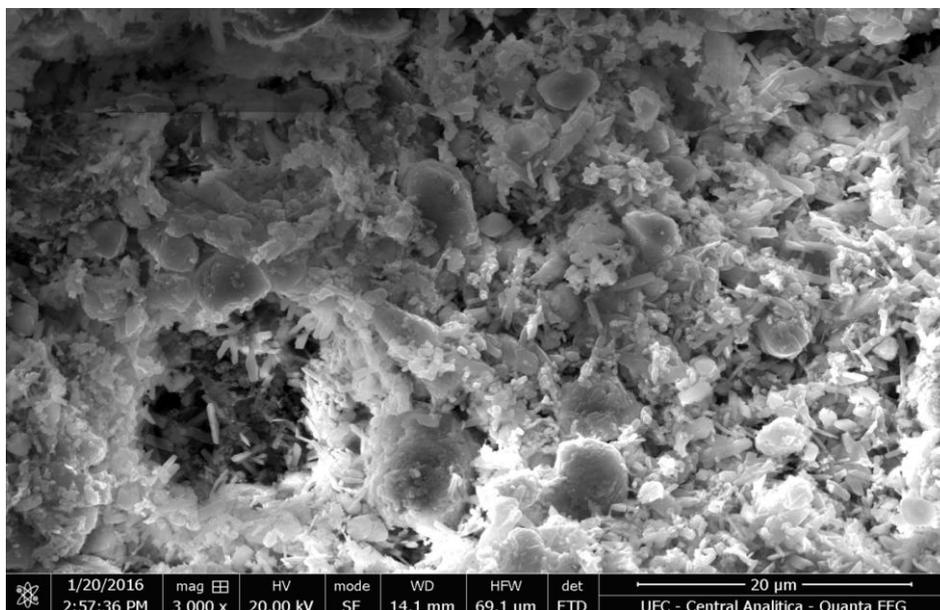


Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

O biocimento β - TCP, segundo Alkhraisat (2008), serve como uma âncora para o osso e promove a formação do osso maduro, nesse caso, este biocimento favoreceu a formação de uma apatita na superfície da amostra, que sugere a bioatividade do material. Segundo Ribeiro (2003) A bioatividade está associada aos fenômenos que ocorrem na interface do material, normalmente, ela é definida como a habilidade de um material ligar-se quimicamente ao osso, através da formação de uma camada de fosfato de cálcio, promovendo uma osteogênese verdadeira.

Os estudos de caracterização pela técnica de microscopia eletrônica de varredura realizada nas superfícies das amostras do biocimento após imersão na solução de SBF, durante os tempos de 60 e 75 dias, evidenciaram uma morfologia formada por cristais de Monetita (DCPA – CaHPO_4) em forma de paralelepípedos, envolvidos por partículas aglomeradas de beta fosfato tricálcio e dióxido de silício (Ver Figura 26).

Figura 26 – Morfologia referente ao teste *in vitro*



Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

A literatura relata que a deposição superficial de uma camada de apatita após imersão no SBF é característica de materiais bioativos (caso do β -TCP) e indicativos da formação de união direta entre o material e o osso em uma situação de implantação “*in vivo*” (XIN *et al.*, 2005). Segundo Kokubo e Takadama (2006), materiais capazes de formar apatita sobre sua superfície em SBF podem unir ao

osso “*in vivo*” pela camada de apatita formada, e, com isso, pode-se afirmar que a bioatividade de um material pode ser prevista pela formação da apatita em SBF.

5 CONCLUSÃO

O método de síntese proposto dessa pesquisa na preparação dos biocimentos diminuiu a quantidade de líquido usado durante o preparo das amostras devido à mistura e homogeneização feitas no moinho de alta energia. O pH do produto final, ficou próximo do intervalo de neutralidade (6,5 - 8,5), o que evita efeitos citotóxicos que poderiam comprometer as características de biocompatibilidade.

O biocimento produzido é composto essencialmente por duas fases (brushita e beta fosfato tricálcio) e contém traços de carbonato de cálcio e silicato tricálcio, conforme os difratogramas de raios X. A fase β -TCP pode favorecer o DCPD nos ensaios biológicos, de acordo com a literatura.

A presença dos grupos funcionais característicos dos fosfatos e as bandas sobrepostas de dióxido de silício verificadas através da espectroscopia de absorção na região de infravermelho confirmam a presença do aditivo no material. Os estudos de caracterização pela técnica de microscopia eletrônica de varredura realizados nas superfícies de fratura das amostras apresentaram morfologias formadas por cristais de diferentes formas (cristais de brushita em forma de placas envolvidas por partículas aglomeradas provavelmente de β -TCP/SiO₂).

Os resultados da resistência mecânica nas diferentes composições de biocimentos mostraram que a porcentagem de aditivo presente influencia na resistência mecânica dos biocimentos, observa-se que um aumento acima de 30% desse aditivo pode reduzir bruscamente a resistência mecânica do material, provavelmente, devido à formação de aglomerados (β -TCP/ SiO₂), que geram poros, diminuindo a resistência mecânica, porém de acordo com a finalidade do biocimento este resultado pode ser considerado satisfatório .

Os resultados das caracterizações biológicas de citotoxicidade indicaram que as análises de proliferação e viabilidade celular realizada apresentaram uma redução estatisticamente significativa da atividade metabólica celular e do percentual de células viáveis e funcionais ao ampliar o tempo de exposição ao biocimento. Entretanto, a exposição das células ao biocimento, durante os períodos avaliados, não produziu alterações importantes no metabolismo das enzimas mitocondriais como também na integridade estrutural do núcleo e atividade enzimática citoplasmática das células (devido ausência de toxicidade), tornando assim, esse

biocimento apto a ser utilizado no desenvolvimento de um produto final. Na análise “*in vitro*”, em solução SBF do biocimento com sílica houve a formação de uma apatita na superfície do material, indicando que o biocimento produzido é bioativo.

De uma forma geral, os biocimentos produzidos são considerados viáveis para aplicações biomédicas, tanto na área ortopédica como na área odontológica, visando substituição e reparação de tecido afetado, conforme as análises química, física e mecânica, o que é confirmada pelos os testes preliminares biológicos, sem efeitos citotóxicos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar o tempo de pega dos biocimentos;
- Realizar os testes biológicos dos biocimentos, seguindo a norma ISO 10993;
- Estudar a incorporação e a liberação de fármacos nos biocimentos, utilizando a técnica CLAE (Cromatografia Líquida de alta eficiência) ;
- Estudar os mecanismos cinéticos de biodegradação dos biocimentos em diferentes meios biológicos em termos da quantificação do teor de sílica;

REFERÊNCIAS

AHN, G.; LEE, J. Y.; SEOL, D. W.; P, S. G.; LEE, D. The effect of calcium phosphate cement–silica composite materials on proliferation and differentiation of pre-osteoblast cells. **Materials Letters**, Elsevier Science direct, v.109, p. 302-305, ago. 2013.

ALKHRAISAT, M. H. A. **Bioactividad de cementos fosfatos cálcicos sustituidos con estroncio y su aplicación em regeneración ósea**. 2008. Tesis en Opción al Grado de Doctor - Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial, Facultad de Odontología, Madrid, ISBN: 978-84-692-1014-7.

ALBUQUERQUE, J. S. V. **Produção de cerâmicas bioativas porosas de apatitas nanométricas para aplicações biomédicas**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

ALBUQUERQUE, J. S. V. **Produção de biocimentos de apatitas nanométricas aplicados como sistemas de liberação controlada de fármacos**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Materiais) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ALONSO, L. M. **Avaliação de cimentos ósseos de Fosfatos de Cálcio com adições de Aluminato e Silicato de Cálcio**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

ALVES, E. R. **Nanocompósitos de cerâmicas bioativas para aplicações biomédicas: síntese, caracterização e propriedades**. 2011, Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

ALVES, H. L. R. **Cimento ósseo de fosfato tricálcio: síntese e influência de aditivos na sua injetabilidade**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Departamento de Materiais da Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ALVES-REZENDE, M. C. R.; DEKON, S. F. C.; GRANDINI, C. R.; BERTOZ, A. P. M.; ALVES-CLARO, A. P. R. Tratamento de superfície de implantes dentários: SBF. **Rev Odontol**, v. 32, p. 38-43, 2011.

ALGE, D. L.; GOEBEL, W. S.; GABRIEL CHU, T-M. In vitro degradation and cytocompatibility of dicalcium phosphate dihydrate cements prepared using the monocalcium phosphate monohydrate/hydroxyapatite system reveals rapid conversion to HA as a key mechanism. **J Biomed Mater Res Part B**, v. 100B, p. 595–602. 2012.

ARIFUZZMAN, S.M.; ROHANI, S. Experimental study of brushite precipitation. **Journal of Crystal Growth**, Elsevier Science direct, v. 267, p. 624-634, jun. 2004.

ARNS, C.W. et al. **Noções Básicas de Cultivo de Células Animais**. Campinas: Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Unicamp. 2004. 74p.

ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS . **Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity. Medical Devices**. Annual book of ASTM Standards. Philadelphia: ASTM, v.13, n.1, p.306-309.1992. ASTM F895/84 (reaprov.1990).

ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas Bioativas – Estado de Arte. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 29, p. 100-104, 2006.

BADYLAK, S.F. The Extracellular Matrix as a Scaffold for Tissue Reconstruction, **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Elsevier Science direct, v. 13, p. 377-383, out.2002.

BALSAMO, S. **A influência da musculação e da hidrogenástica na densidade mineral óssea**. 2002. Dissertação (Mestrado em Educação Física), Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2002.

BARRALET, J.; LILLEY, K. J.; GROVER, L. M.; FARRAR, D. F.; ANSELL, C.; GBURECK, U. Cements from nanocrystalline hydroxyapatite. **Journal of Materials Science**, Materials in Medicine, v. 15, p. 407-411, abr. 2004.

BARRERE, F.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE GROOT, K. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution. **Biomaterials**, v. 23 (9), p. 1921-30. 2002.

BASES DE DADOS - CAPES, disponível em:
< <http://www.portaldapesquisa.com.br/databases/sites> >. Acesso em 26 fevereiro 2010.

BERGER, M.; PROBST, F.; SCHWARTZ, C.; CORNELSEN, M.; SEITZ, H.; EHRENFELD, M.; OTTO, S. A concept for scaffold-based tissue engineering in alveolar cleft Osteoplasty. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v.43, p. 830-836, mai. 2015.

BOHNER, M. Calcium orthophosphates im medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury, Int. J. Care**, Elsevier Science direct, v. 31, p. D37-D47, dez. 2000.

BOHNER, M.; LEMAITRE, J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2175-2179, 2009.

BOTELHO, C. M.; BROOKS, R. A.; BEST, S. M.; LOPES, M. A.; SANTOS, J. D.; RUSHTON, N. Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite. **JBiomed Mater Res**, Wiley Online Library, v. 79A, p. 723-730, jul.2006.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation, **Nature**, International weekly Journal of Science, v. 423, p. 337-342, mai. 2003.

BUGARIN JUNIOR, J. G.; GARRAFA, V. Bioética e biossegurança: uso de biomateriais na prática odontológica. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 223-228, abr. 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102007000200008&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 30 maio 2016.

BUI, X. V. **Elaboration de biomatériaux verres substances actives (zolédronate chitosane). Caractérisations physico-chimiques. Expérimentations “in vitro.”** 2011. These de Docteur, Ecole doctorale Sciences de la Matière, Université de Rennes, 2011.

BUIZER, A.T.; VELDHUIZEN, A.G.; BULSTRA, S.K.; KUIJER, R. Static versus vacuum cell seeding on high and low porosity ceramic scaffolds. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29(1), p. 3–13, 2014.

CAMIRÉ, C. L.; SAINT –JEAN, S. J.; MOCHALES, C.; NEVSTEN, P.; WANG, J. S.; LIDGREN, L.; MCCARTHY, I.; GINEBRA, M. P. Material characterization and in vivo behavior of silicon substituted alpha-tricalcium phosphate cement. **J Biomed Mater Res**, Wiley Online Library, v. 76B, p. 424-431, fev. 2006.

CARDENAS, L. J.; TAKEUCHI, A.; MATSUYA, S.; ISHIKAWA, K. Effects of tricalcium silicate addition on basic properties of α -tricalcium phosphate cement. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, J-Stage, v.116, p. 83-87, jan. 2008.

CARNEIRO, A. C. de S. **Obtenção de cerâmicas à base de tricálcio fosfatos utilizando óxido de magnésio como aditivo.** 2007, Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

CARPINETTI, L. C. R., (2000). **Planejamento e análise de experimentos.** EESC-USP. São Carlos.

CARRODÉGUAS, R. G. **Cementos óseos de fosfatos de cálcio.** 2000. Tesis de Doctorado - Centro de Biomateriales, Universidade de la Habana, Habana, Cuba, 2000.

CARRODEGUAS, R.G.; DE AZA, A.H.; TURRILLAS, X.; PENA, P.; DE AZA, S. New approach to the β - α polymorphic transformation in magnesium-substituted tricalcium phosphate and its practical implications. **Journal of the American Ceramic Society**, Wiley Online Library, v. 91, p. 1281-1286, abr. 2008.

CARREÑO, N. L. V.; GARCIA, I. T. S.; LEITE, E. R.; SANTOS, L.P.S.; LONGO, E.; FAJARDO, H.V.; PROBST, L. F. D.; FABBRO, M. T., Ceramic nanocomposites from high-energy mechanical milling process. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 962-968, jul. 2008.

CHEN, D. H.; HSIEH, C. H. Synthesis of nickel nanoparticles in aqueous cationic surfactant solutions, **Journal of Materials Chemistry**, v. 12, p. 2412-2415, jun. 2002.

COSTA, M. E. J. V. **Precipitação de Pós Cerâmicos**. 1988. Tese (Doutorado) Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro, 1988.

CUNHA, S. M.; LAZAR, D. R. R.; USSUI, V.; FANCIO, E.; DE LIMA, N. B.; BRESSIANI, A. H. A. **Sinterabilidade e dureza de cerâmicas a base de fosfatos de cálcio sintetizadas por precipitação homogênea**. In: 50º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2006, Blumenau, **Anais do 50º Congresso Brasileiro de Cerâmica**, 2006, p. 16-20.

CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V.L.; O'CONNOR C.J. Recent Advances in the Liquid-Phases Syntheses of Inorganic Nanoparticles, **Chemical Review**, 104(9), p. 3893-3946, set. 2004.

DAHABREH, Z.; PANTELI, M.; POUNTOS, I.; HOWARD, M.; CAMPBELL, P.; GIANNOUDIS, P. V. Ability of bone graft substitutes to support the osteoprogenitor cells: An in-vitro study. **World J Stem Cells**; v. 6(4): p. 497-504. ISSN 1948-0210 (online), sep. 2014.

DANTAS, T.S.; LELIS, E.L.; NAVES, L.Z.; FERNANDES-NETO, A.J.; MAGALHÃES, D. Materiais de enxerto ósseo e suas aplicações na Odontologia. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v.13, n.2, p. 131-5, mar. 2011.

DOURADO, E. R. **Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio**. 2006. Dissertação (Mestrado em Física) - Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, 2006.

DOWNING, D.; CLARK, J. **Estatística Aplicada**. 1ª Ed. São Paulo: Saraiva, 2000, 139p.

FERREIRA, O. J. B. **Síntese do α -fosfato tricálcico e estudo da modificação de cimentos de fosfato de cálcio com silicato tricálcico**. 2009. Monografia (Graduação em Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

FRANTZÉN, J.; PÄLLI, A.; KOTILAINEN, E.; HEINO, H.; MANNERSTRÖM, B.; HUHTALA, H.; KUOKKANEN, H.; SÁNDOR, G.K.; LEINO, K.; RÖYTTÄ, M.; PARKKOLA, R.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S.; ARO, H.T.; HAIMI, S. In Vivo and In Vitro Study of a Polylactide-Fiber-Reinforced β -Tricalcium Phosphate Composite Cage in an Ovine Anterior Cervical Intercorporeal Fusion Model. **Int J Biomater**. v. 2011, p.1-11, ago. 2011, id.109638.

FREUND, J. E.; SIMON, G. A. **Estatística Aplicada: economia, administração e contabilidade**, 9ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2000, 404p.

GARCÍA, R.; SANTOS, L. A.; DE OLIVEIRA, L. C.; DA SILVA, E. C.; ORTEGA, A.; PADILHA, S. Cements de fosfato tricálcico de fraguado doble, **Revista CENIC**, Ciências Químicas, v.30, p. 153-158, jun. 1999.

GARCIA DIAZ, A.; PHILLIPS, D.T. **Principles of experimental design and analysis**. Chapman & Hall. London. 1995.

GLEITER, H. **Nanostructured materials: State of art and perspectives**. in: 2nd Int. Conf. On Nanostructured Materials, 3-7 Out. 1994, Stuttgart, Germany.

GOMES, S.; RENAUDIN, G.; MESBAH, A.; JALLOT, E.; BONHOMME, C.; BABONNEAU, F.; NEDELEC, J. M. Thorough analysis of silicon substitution in biphasic calcium phosphate bioceramics: A multi-technique study, **Acta Biomaterialia**, Elsevier Science direct, v. 6, p. 3264-3274, ago. 2010.

GOMIDE, V.S. **Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânia para fins biomédicos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

GOUVEIA, D. S. **Obtenção de pós nanométricos de hidroxiapatita sintetizados com magnésio utilizando ultra-som**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GROVER, L. M.; GBURECK, U.; YOUNG, A. M.; WRIGHT, A. J.; BARRALET, J. E. Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of β -TCP-Pyrophosphoric acid bone cement. **J Mater Chem**, RSC. Publishing, v. 15, p. 4955-4962, out. 2005

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p.1352-1358, maio 2010.

HE, S.; YAO, J.; XIE, S.; PANG, S.; GAO, H. Investigation of passivated silver nanoparticles, **Chemical Physical Letter**, v. 343, p. 28-32, mar. 2001.

HERCULIAN, P. P.; CESTARI, T. M.; TAGA, E. M.; TAGA, R. Enxertos xenógenos: tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. **Revista Brasileira de Implantologia**, São Paulo, v. 6, p. 7-14, abr/jun2000.

HUAN, Z.; CHANG, J. Calcium-phosphate-silicate composite bone cement: self-setting properties and in vitro bioactivity. **J Mater Sci**, Mater Med, v. 20, p. 833-841, abr. 2009.

ISO document, 10993-5, 1992 **International Standard**: Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; RALPHO, R.; DOS REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar, **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 518-522, jul/ago 2000.

KIM, K.; OH, J.; JIN, G.; LEE, J.; OH, D.; KANG, H.; *et al.* Preparation and evaluation of PLGA-silica scaffold with humana dipose-derived stromal cells for bone tissue engineering. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 7, p. 291-297, 2010.

KLAMMERT, U.; REUTHER, T.; JAHN, C.; KRASKI, B.; KÜBLER, A.C.; GBURECK, U. Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing. **Acta Biomater**, v.5(2), p. 727-34. fev.2009.

KLEIN, C. P. A.; WOLKE, J. G. C.; DE GROOT, K. **Stability of calcium phosphate ceramics and plasma sprayed coatings**. 1ª Ed, In: An Introduction to Bioceramics, Gainesville, USA, World Scientific, 1993.

KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.24, p. 721-734, 1990.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, p. 2907-2915, 2006.

KRAFT, L. **Calcium aluminates based cements as dental restorative materials**. 2002. Thesis, Uppsala University, 2002.

LANGSTAFF, S.; SAYER, M.; SMITH, T. J. M.; PUGH, M. Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response **Biomaterials**, Elsevier Science direct, v. 22, p. 135-150, jan. 2001.

LARSSON, S.; BAUER, TW. Use of injectable calcium phosphate cement for fracture: a review. **Clin Orthop Relat Res**, Oxford, n. 395, p. 23-32, 2002.

LEAL, C. V. **Desenvolvimento e Avaliação In Vitro de um cimento de fosfato de cálcio**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

LEROUX, T.; PEREZ-ORDONEZ, B. P.; VON SCHROEDER H. Osteolysis after the use of a silicon-stabilized tricalcium phosphate-based bone substitute in a radius fracture: a case report. **The Journal of Hand Surgery**, Elsevier Science direct, v. 32, p. 497-500, abr. 2007.

MACHADO, J. L. M. **Desenvolvimento de cimento ósseo de fosfato de cálcio como para o crescimento de tecido**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

- MAMANI, J. B. **Estrutura e propriedades de nanopartículas preparadas via sol-gel**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- MARTIN, C. P.; BLUNT, M. O.; MORIATY, P. Nanoparticle Networks on Silicon : Self-Organized or Disorganized ? **Nano Letters**, ACS Publications, v. 4, p. 2389-2392, out. 2004.
- MARTIN-PIEDRA, M. A.; GARZON, I.; OLIVEIRA, A. C.; ALFONSO-RODRIGUEZ, C. A.; SANCHEZ-QUEVEDO, M. C.; CAMPOS, A.; ALAMINOS, M. Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. **Cytotherapy**, v.15(4), p. 507-518, abr. 2013.
- MATOS, L.; SANTOS, P.; BARBOSA, F. As Nanopartículas em Ambientes Ocupacionais - **Nanoparticles in Occupational Environmental**. [S.I.], fev. 2011.
- MELO, C.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia, **Parcerias estratégicas**, n. 18, [s.n.], ago. 2004.
- MESTRES, G.; LE VAN, C.; GINEBRA, M. P. Silicon-stabilized α -tricalcium phosphate and its use in a calcium phosphate cement: Characterization and cell response, **Acta Biomaterialia**, Elsevier Science direct, v. 8, p.1169-1179, mar. 2012
- NIEMEYER, C.M. Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science. **Angewandte Chemie International Edition**, v.40, p. 4128-4158, nov. 2001.
- OHTSUKI, C.; KUSHITANI, H.; KOKUBO, T.; KOTANI, S. YAMAMURO, T. Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass ceramic in the body. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 25, p. 1363-1370, 1991.
- OLIVEIRA, F. P. DE. **Influência do processamento na obtenção de biocerâmicas à base de hidroxiapatita**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
- OLIVEIRA, M. M., **Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades**, 2005. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal Paraná, Curitiba, 2005.
- OLIVEIRA, A. C.; RODRÍGUEZ, I. Á.; GARZÓN, I.; MARTÍN-PIEDRA, M. Á.; ALFONSO-RODRÍGUEZ, C. A.; GARCÍA, J. M.; SÁNCHEZ-QUEVEDO, M. DEL C.; ALAMINOS, M. An early and late cytotoxicity evaluation of lidocaine on human oral mucosa fibroblasts. **Exp Biol Med (Maywood)**. v. 239(1), p. 71-82, jan.2014.
- OOMS, E. M.; EGGLEZOS, E. A.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A. Self-tissue response to injectable calcium phosphate cements. **Biomaterials**, Elsevier Science direct, v. 24, p. 749-757, fev. 2003.

OYANE, A.; KIM, H. M.; FURUYA, T.; KOKUBO, T.; MYAZAKI, T.; NAKAMURA T. Preparations and assessment of revised simulated body fluids. **J Biomed Mater Res**. 65A, p.189-95. 2003.

PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. Ceramic Biomaterials, **Biomaterials Principles and Applications**, 1ª ed. New York CRC Press LLC, 2002. cap. 2, p.21-53.

PATEL, N.; BEST, S. M.; BONFIELD, W.; GIBSON, I. R.; HING, K. A.; DAMIEN, E.; REVELL, P. A. A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. **J Mater Sci, Mater Med**, v. 13, p.1199-1206, dez. 2002.

PRADO DA SILVA, M. H.; LIMA, J. H. C.; SOARES, G. A.; ELIAS, C. N.; ANDRADE, M. C.; BEST, S. M.; GIBSON, I. R. Transformation of monetite to hydroxyapatite in bioactive coatings titanium. **Surface and Coatings Technology**, Elsevier Science direct, v.137, p. 270-276, mar. 2001.

PHAN, P.; GRZANNA, M.; CHU, J.; POLOTSKY, A.; EL GHANNAM, A.; VAN HEERDEN, D.; HUNGERFORD, D. S.; FRONDOZA, C. G. The effect of silica containing calcium phosphate particles on human osteoblas sin vitro. **J.Biomed Mater Res**, Wiley Online Library, v. 67A, p. 1001-1008, dez. 2003.

PEITL FILHO, O. **Vitro-cerâmica bioativa de alto desempenho mecânico**. 1995. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.

PETTO DE SOUZA, J. C. **Estudo e caracterização de pós nanoestruturados de fosfatos de cálcio e nanocompósitos de fosfatos de cálcio/Al₂O₃-α sol - gel para aplicações biomédicas**. 2009, Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2009.

PIETAK, A. M.; REID, J. W.; STOTT, M. J.; SAYER, M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. **Biomaterials**, Elsevier Science direct, v. 28, p. 4023-4032, out. 2007

PIORINO NETO, F. **Estudo do ensaio de anel em compressão diametral para caracterização de cerâmicas em temperaturas ambiente e elevadas**. 2000. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais), Faculdade de Engenharia Química, Lorena, 2000.

PIRATELLI FILHO, A. **Método para avaliação do desempenho de máquinas de medir a três coordenadas através de planejamento de experimentos**. 1997. São Carlos. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997.

PORTER, A. E.; PATEL, N.; SKEPPER, J. N.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. Effect of sintered silicate substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone–implant interface. **Biomaterials**, Elsevier Science direct, v. 25, p. 3303-3314, jul. 2004.

- RAMALHO, E. G. **Obtenção de cerâmicas à base de tricálcio fosfatos utilizando óxido de manganês como aditivo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.
- RIBEIRO, C. **Processamento e caracterização de cerâmicas a base de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- RODRIGUES, L. R. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita e titânia nanoestruturadas para a fabricação de compósitos**. 2008, Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in Vitro**, v. 14(6), p. 497-504, 2000.
- ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Mater. Res.** v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- SAITO, E.; SUAREZ-GONZALEZ, D.; MURPHY, W. L.; HOLLISTER, S. J. Biomineral Coating Increases Bone Formation by Ex Vivo BMP-7 Gene Therapy in Rapid Prototyped Poly(L-lactic acid) (PLLA) and Poly(ε-caprolactone) (PCL) Porous Scaffolds, **Adv. Healthcare Mater**, v. 4, p. 621–632, 2015.
- SANCHEZ-QUEVEDO, M. C.; ALAMINOS, M.; CAPITAN, L. M.; MOREU, G.; GARZON, I.; CRESPO, P. V.; CAMPOS, A. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. **Histol Histopathol**, v. 22(6), p. 631-40, jun. 2007.
- SANTANA, J. G. A. **Desenvolvimento de cerâmicas multicamadas de carbeto de silício destinadas a aplicações térmicas**. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica na Área de Projetos e Materiais), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.
- SANTOS, L. A.; GARCIA, R.; BOSCHI, A. O.; DE ARRUDA, A. C. F. Fiber enriched Double setting calcium phosphate boné cement. **J. Biomed Mater Res**, Wiley Online Library, v. 65A, p. 244-250, maio 2003.
- SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras pra o uso na área médico-odontológica**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Biomateriais), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2002.
- SENA, L. A. DE. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colageno para aplicações biomédicas**. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

- SILVA, D. F. DA. **Síntese e Caracterização de Biomateriais de Fosfatos de Cálcio a Partir de Conchas Calcárias Fossilizadas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Centro de Ciências Tecnológicas Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2012.
- SILVA, S. N.; PEREIRA, M. M. Comparação in vitro da reatividade de diferentes biocerâmicas na forma de pós e grânulos, In: 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais – COLAOB, 2012, Natal-RS. **Anais do 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**, 2012, p. 1-20.
- SU, J.; CAO, L.; YU, B.; WANG, Z.; CHEN, X.; LI, M. Study on preparation and properties of self-setting silicon hydroxyapatite bone cement. **J Inorg Mater**, v. 26, p. 55–60, jan. 2011.
- SCHMITZ, J. P., HOLLINGER, J. I., MILAM, S. B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. **J. Oral. Maxillofac. Surg.**, Elsevier Science direct, v. 57, p. 1122-1126, set. 1999.
- SPIM, J. A.; SANTOS, C. A.; GARCIA, A. **Ensaio dos Materiais**, Rio de Janeiro: LTC: Livros Técnicos e Científicos, Editora S.A, 2000, 247 p.
- STANLEY, P. Mechanical strength testing of compacted powders. **International Journal of Pharmaceutics**, Elsevier Science direct, v. 227, p. 27-38, out. 2001.
- TAKADAMA, H.; HASHIMOTO, M.; MIZUNO, M.; KOKUBO, T. Round-robin test for SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. **PHOS RES BULL**, v. 17, p. 119-25, 2004.
- VIALE-BOURONCLE, S.; BEY, B.; REICHERT, T. E.; SCHMALZ, G.; MORSCZECK, C. b-Tricalcium-phosphate stimulates the differentiation of dental follicle cells. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 22, p. 1719–1724, mai.2011.
- VIAU, G.; FIÉVET-VINCENT, F.; FIÉVE, T F. Nucleation and growth of bimetallic CoNi and FeNi monodisperse particles prepared in polyols, **Solid State Ionics**, v.84, p. 259-270, 1996.
- VIEIRA, M. F. **Separação de Ampicilina Produzida Enzimaticamente por Reação entre Ester Metílico de Fenilglicina e Ácido 6-aminopenicilânico**. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos – SP, 2003.
- VIEIRA, S. **Análise de variância (ANOVA)**. 1ª Ed. São Paulo: Atlas, 2008, 204p.
- WATANABE, M.; TANAKA, M.; SAKURAI, M.; MAEDA, M. Development of calcium phosphate cement. **Journal of the European Ceramic Society**, Elsevier Science direct, v. 26, p. 549-552, 2006.
- XIN, R.; LENG, Y.; CHEN, J.; ZHANG, Q. A comparative study of calcium phosphate

formation on bioceramics in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 26, p. 6477-6486, 2005.

YEONG, K. C. B.; WANG, J.; NG, S. C. Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO₄, **Biomaterials**, Elsevier Science direct, v. 22, p. 2705-2712, out. 2001.

YOSHICO, S.; BANNO, H.; MIZUNO, M.; SAITO, H. Sintesis of compositional regulated hydroxyapatite from Ca(OH)₂ and H₃PO₄. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, int. Edition, v. 101, p. 642-647, 1993.

ZHAO, Q.; QIAN, J.; ZHOU, H.; YUAN, Y.; MAO, Y.; LIU, C. In vitro osteoblast-like and endothelial cells' response to calcium silicate/calcium phosphate cement. **Biomed Mater**, v. 5, p. 35004, jun. 2010.

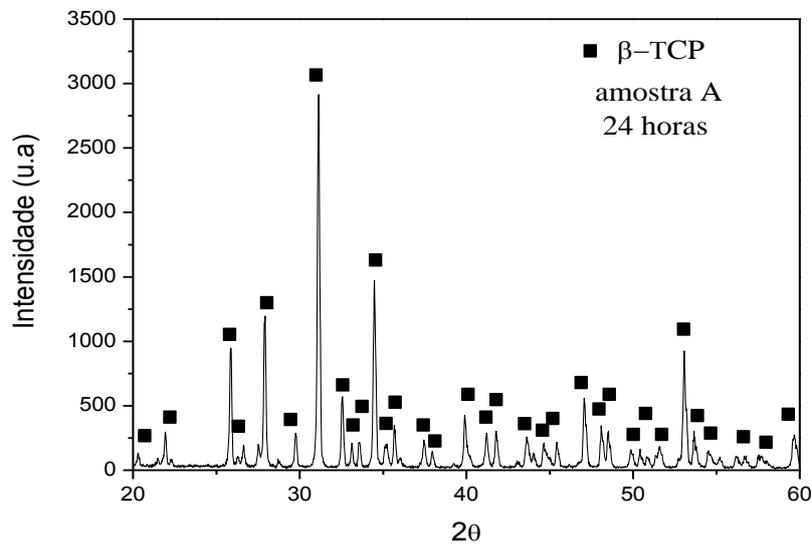
ZHOU, S.; MA, J.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M.;• DORIN RUSE, N.; YANG, Q.; TROCZYNSKI, T. In vitro studies of calcium phosphate silicate bone cements, **J Mater Sci: Mater Med**, v. 24, p. 355–364, 2013.

APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO DO PÓ E DO ADITIVO

A1 Difração de Raios X dos pós biocerâmicos sinterizados a 1200°C.

No difratograma de raios X do pó biocerâmico de fosfato de cálcio sinterizado a temperaturas de 1200°C por 1 hora, pode ser observado às fases cristalinas do beta fosfato tricálcio, conforme a Figura 27.

Figura 27 – Difratograma de raios X do pó sinterizado a 1200°C.



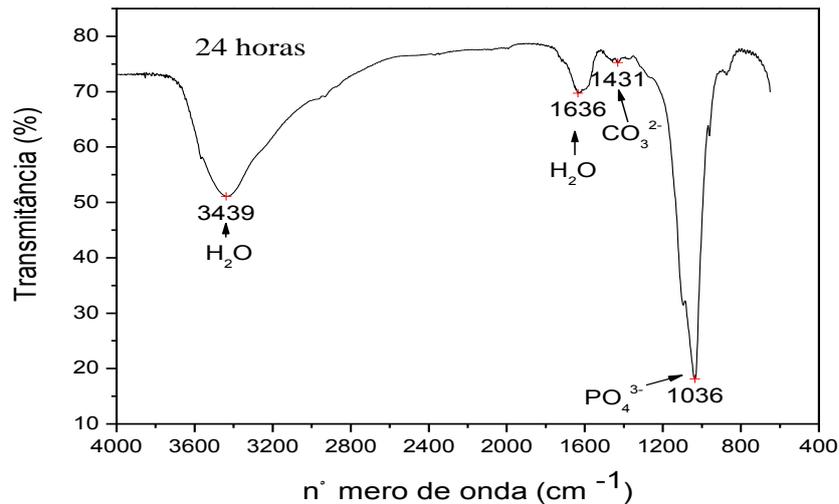
Fazendo uma análise geral do difratograma observa-se que a amostra (A) possui os picos representativos do beta fosfato tricálcio (β -TCP) após sinterizada. A presença da fase β -TCP na amostra sinterizada a 1200°C, se explica pela transformação de fase, em estado sólido, da hidroxiapatita deficiente em cálcio (d-HA) submetida a temperaturas acima de 700°C (Sena, 2004). Lembrando que a d-HA é caracterizada pela razão Ca/P e sua razão molar pode variar de 1,5 a 1,67.

A2 Espectrograma de Infravermelho dos pós biocerâmicos

No espectrograma da Figura 28 dos pós foram identificados os grupos funcionais fosfatos, água e carbonatos na amostra. Os íons carbonato geralmente são incorporados aos precipitados em substituição de hidroxilas ou fosfatos, quando

a síntese é realizada ao ar, em meio fortemente alcalino. Em apatitas biológicas íons carbonatos também estão presentes, conduzindo à maior solubilidade deste composto (Elliott, 1994 apud Alves, 2011).

Figura 28 – Espectrograma de infravermelho do pó



A3 BET

O método BET é utilizado para determinar a área superficial específica de pós cerâmicos. A análise de área superficial possibilita a obtenção teórica do tamanho médio das partículas do material. Os dados relativos ao ensaio BET para o pó sintetizado no laboratório via precipitação em solução aquosa e do dióxido de silício são apresentados na Tabela 12. Pode-se verificar que os pós sintetizados são considerados nanopartículas, pois possuem tamanho (em termos de diâmetro) entre 1 e 100 nanômetros. De acordo com Santos (2009), diferentes métodos de sínteses vêm sendo utilizados, na produção de pós nanoestruturados de fosfatos de cálcio, sempre procurando obter partículas com tamanho nanométrico, com área superficial elevada, já que estas características são importantes para os estudos de reparação e reconstituição do tecido ósseo.

Tabela 12 – Resultados da análise de BET.

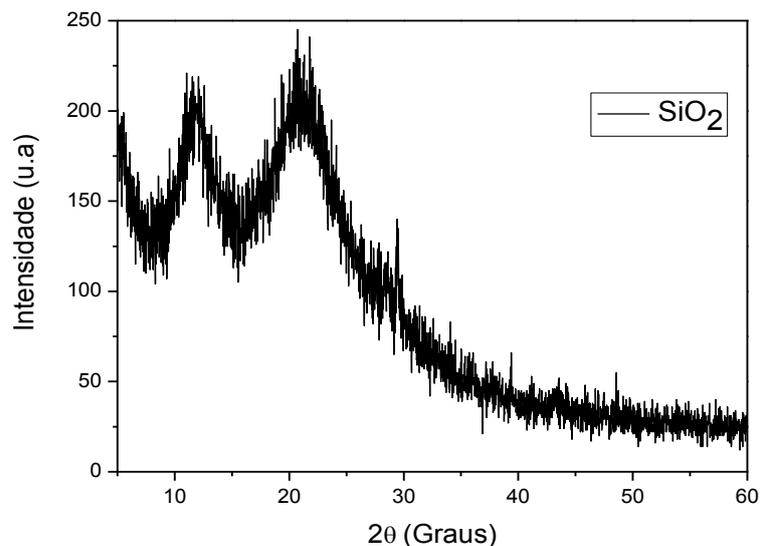
Amostra	Área Superficial BET (m ² /g)	Diâmetro médio das partículas (nm)
Pós	47,80	40
Dióxido de silício	127,50	18

FONTE: PRÓPRIO AUTOR.

A4 Difração de raios X do dióxido de silício.

A Figura 29 mostra análise de difração de raios X do dióxido de silício. Observa-se que esse material é amorfo.

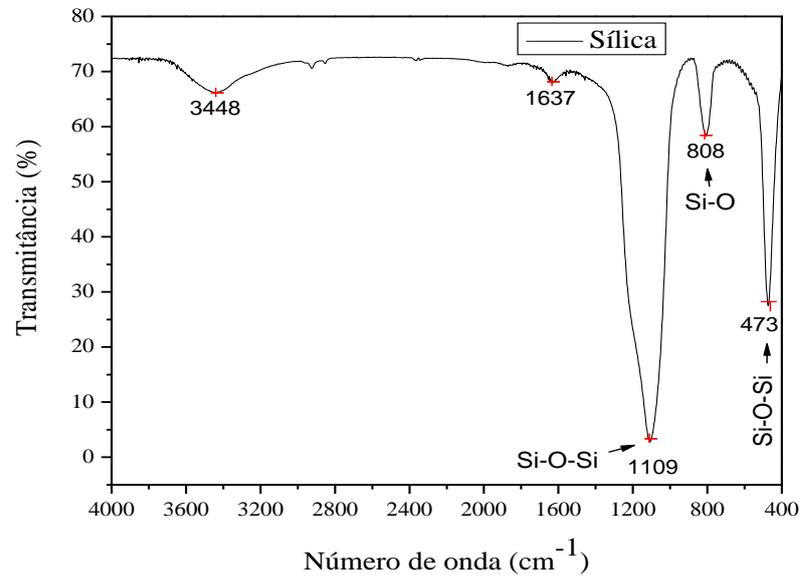
Figura 29 – Difratoograma de raios X do dióxido de silício



A5 Espectrograma de Infravermelho do dióxido de silício.

Por meio da espectrometria de infravermelho foi possível identificar qualitativamente as fases de sílica formadas. São encontradas as bandas de estiramento assimétrico em 473 cm⁻¹ e 1109 cm⁻¹ no espectro da sílica. Figura 30 mostra o espectrograma de infravermelho do dióxido de silício.

Figura 30 – Espectrograma de infravermelho do dióxido de silício.



APÊNDICE B – Teste de Homogeneidade da Variância dos Biocimentos
(Teste de Levene)

Tabela 13 – Teste de Levene correspondente à compressão diametral dos biocimentos

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Aditivo	0,00499	5	9,98127E-4	1,9713	0,17744
Resíduo	0,00456	9	5,06329E-4		

Com base na Tabela 13, o p-valor é maior que o valor α especificado 5% (0,05). Observa-se que não existem diferenças significativas entre as quatro variâncias, ou seja, é razoável pressupor que as concentrações das quatro formulações produzem resistência com igual quantidade de variabilidade.

Tabela 14 – Teste de Levene correspondente ao pH dos biocimentos

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Aditivo	0,00117	4	2,91852E-4	0,8914	0,50374
Resíduo	0,00327	10	3,27407E-4		

O teste de Levene testa a hipótese nula, como o p-valor na Tabela 14 é maior que 5%, não temos evidências para rejeitar a hipótese de igualdade de variâncias.

PUBLICAÇÕES

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

ALVES, E. R.; ALBUQUERQUE, J. S. V.; NOGUEIRA, R. E. F. Q. CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS BIOCIMENTOS DE BRUSHITA/FOSFATO TRICÁLCIO INCORPORADOS COM DIÓXIDO DE SILÍCIO POR PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS. In: 58 Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2014, Bento Gonçalves. Anais do 58 Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2014.

ALVES, E. R.; ALBUQUERQUE, J. S. V.; NOGUEIRA, R. E. F. Q.; LIMA, J. D. F.; JUNIOR, L. C. G. P.; DEUS, E. P.; BRANDAO, A. S. ANÁLISE NUMÉRICA E EXPERIMENTAL DE PROPAGAÇÃO DE TRINCA APLICADA A BIOCIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO. In: 67º Congresso da ABM, 2012, Rio de Janeiro. Anais do 67º Congresso da ABM.

ALVES, E. R.; ALBUQUERQUE, J. S. V.; NOGUEIRA, R. E. F. Q. BIOCIMENTOS DE FOSFATO DE TRICÁLCIO REFORÇADOS COM SÍLICA NANOMÉTRICA. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2012, Joinville. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais.

ALVES, E. R.; ALBUQUERQUE, J. S. V.; NOGUEIRA, R. E. F. Q.; VALES, J. C. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCIMENTOS À BASE DE APATITAS NANOMÉTRICAS. In: VII Congresso nacional de Engenharia Mecânica, 2012, São Luiz. VII Congresso Nacional de Engenharia Mecânica.

ALVES, E. R.; ALBUQUERQUE, J. S. V.; SILVA, P. D.; NOGUEIRA, R. E. F. Q.; INFLUÊNCIA DA RAZÃO Ca/P NA SÍNTESE DE BETA FOSFATO TRICÁLCIO NANOMETRICO. In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012, Rio de Janeiro. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química.