

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DOUTORADO

**CIMENTOS BIOATIVOS INJETÁVEIS FUNCIONALIZADOS COM
PEPTÍDEO OSTEOGÊNICO PARA REPARAÇÃO ÓSSEA**

LARISSA MENDES DE LÁZARI

ARARAQUARA
2016

LARISSA MENDES DE LÁZARI

**Cimentos bioativos injetáveis funcionalizados com
peptídeo osteogênico para reparação óssea**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar
Co-orientadores: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto
Dr. Miguel Angel Rodriguez

**Araraquara
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

L431c Lázari, Larissa Mendes de
Cimentos bioativos injetáveis funcionalizados com
peptídeo osteogênico para reparação óssea / Larissa Mendes
de Lázari – Araraquara : [s.n], 2016
220 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Ana Maria Minarelli Gaspar
Coorientador: Reinaldo Marchetto; Miguel Angel
Rodriguez

1. Materiais biomédicos. 2. Sílica. 3. Peptídeos-síntese.
4. Sobrevivência celular. 5. Regeneração óssea. I. Título.

LARISSA MENDES DE LÁZARI

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 24 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA



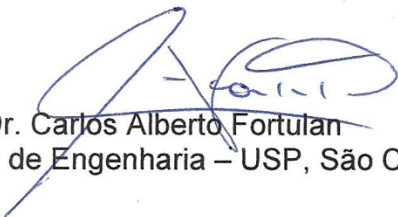
Profª Drª Ana Maria Minarelli Gaspar
Faculdade de Odontologia – UNESP, Araraquara



Profª Drª Marlus Chorilli
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan
Escola de Engenharia – USP, São Carlos



Profª Drª Eliana Cristina da Silva Rigo
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP, Pirassununga

DADOS CURRICULARES

Larissa Mendes de Lázari

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- | | |
|--------------|--|
| 2013 – atual | <p><i>Doutorado em Biotecnologia</i></p> <p>Universidade Estadual Paulista – UNESP</p> <p>Título: Cimentos bioativos injetáveis funcionalizados com peptídeo osteogênico para reparação óssea</p> <p>Orientadora: Ana Maria Minarelli Gaspar</p> <p>Bolsista: FAPESP</p> |
| 2013 – 2013 | <p><i>Doutorado Sanduíche</i></p> <p>Instituto de Ceramica y Vidrio – CSIC-ICV, Madrid, Espanha</p> <p>Título: Vitro-cerâmica mesoporosa bioativa e injetável funcionalizada com peptídeo osteogênico para regeneração óssea</p> <p>Orientador: Miguel Angel Rodriguez</p> <p>Bolsista: Capes-PDSE</p> |
| 2012 – 2013 | <p><i>Doutorado em Biotecnologia</i></p> <p>Universidade Estadual Paulista – UNESP</p> <p>Título: Vitro-cerâmica mesoporosa bioativa e injetável funcionalizada com peptídeo osteogênico para regeneração óssea</p> <p>Orientadora: Ana Maria Minarelli Gaspar</p> |

Bolsista: CAPES

2010 – 2012

Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Título: Síntese de nanopartículas de sílica mesoporosa e
aplicações como biomaterial

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Bolsista: CAPES

.

2005 – 2009

Graduação em Ciências Biológicas

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - FEIS

Universidade Estadual Paulista – UNESP

DEDICATÓRIA

*À **Deus**, por me manter em pé todas as vezes que quis cair,*

*Aos meus pais, **Ivanil e Aparecida**, onde quer que estejam, espero que estejam orgulhosos
pelos caminhos e decisões que eu segui em vossa ausência física,*

*Ao meu grande companheiro, **Hudson**, pelo apoio, pela compreensão sem medida, por me
compreender e estar sempre ao meu lado.*

Aos meus amigos e à minha família, por compreender minha ausência nesses últimos anos.

AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora, Prof(a). Dr(a). **Ana Maria Minarelli Gaspar**, pela confiança, pela disposição, por confiar no meu trabalho e, principalmente, pela amizade e horas de conversa.*

*Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Reinaldo Marchetto**, por permitir que eu continuasse a trabalhar no seu laboratório e com os estudos sobre o peptídeo OGP.*

*Ao meu co-orientador Dr. **Miguel Angel Rodriguez**, pela orientação durante o doutorado sanduíche no ICV-CSIC em Madrid. Mesmo que não aceitasse, continuarei te chamando de professor, por ter me ensinado muito sobre cerâmicas, pela dedicação e pelas longas conversas durante as microscopias.*

*Ao Dr. **Raul Carrodegua**, por ter me ajudado com o Doutorado Sanduíche, me acolhido em Madrid e pela amizade.*

*À Prof(a). Dr(a). **Ticiane Capote** e sua aluna, **Fernanda Coelho**, do Laboratório de Genética da Faculdade de Odontologia, FOAr-Unesp, pelos “longos” testes in vitro e pela ajuda nas análises estatísticas.*

*Ao Prof. Dr. **Rodrigo Cardoso**, em especial à sua aluna **Adriana Arruda Matos**, da Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB-USP, pela disposição em realizar os testes in vitro.*

*Ao Prof. Dr. **Iguatemy Lourenço Brunetti**, por permitir a realização dos testes in vivo no biotério do Departamento de Análises Clínicas, FCFAr-Unesp, sob sua responsabilidade.*

*Ao Prof. Dr. **Paulo Cerri**, por disponibilizar o Laboratório de Histologia para o processamento histológico, na Faculdade de Odontologia, FOAr-Unesp, em especial ao técnico em histologia **Luís Potenza**, pelo auxílio na confecção das lâminas e pela amizade.*

*À Prof(a). Dr(a). **Estela Cerri**, por disponibilizar o uso do microscópio de fluorescência.*

*À Prof(a). Dr(a). **Andrea Gonçalves**, em especial ao técnico em radiologia **Marcus Olivi**, pelas inúmeras imagens de raios X e análise de densidade.*

Aos meus amigos do Grupo de Síntese, Estrutura e Aplicações de Peptídeos e Proteínas, em especial **Aline, Esteban, Norival, Júlia, Matheus, Paulo, Camila**, assim como aos Professores **Eduardo Cilli e Saulo Santesco**, e **todos os alunos** que por lá estiveram, pela amizade, pela ajuda direta e indireta no desenvolvimento deste trabalho e por me aguentar meus dramas e lamentações (rs).

Aos meus amigos do Laboratório de Genética, em especial à Prof(a). Dr(a). **Raquel Scarel Caminaga** e seus alunos, **Giovanna, Rafael, Livia, Romerito e Sâmia** e sua irmã **Sâmara**, pela amizade e companheirismo.

À minha amiga Ms. **Suzane Pigossi**, por não ter medido esforços em me ajudar nos testes in vivo, pelas horas infinitas de cirurgia e pela ajuda nas interpretações dos resultados; além de me compreender, confiar no meu trabalho e sempre me explicar sobre os assuntos que fogem do meu conhecimento.

À amiga Dr(a). **Sybele Saska**, por sempre me ajudar quando eu preciso, mesmo que esteja ocupada com as suas obrigações e por compartilhar as novas informações sobre biomateriais.

Ao Dr. **Guilherme Oliveira**, por me ajudar inúmeras vezes com as análises de histometria e estatísticas.

À técnica em histologia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, **Ana Cláudia Gregolin Costa Miranda**, por não ter medido esforços em me ajudar com as imagens de microscopia e o respectivo microscópio.

Aos meus alunos de iniciação científica, **Ana Luísa e Danilo**, por terem me ajudado nos ensaios in vitro e in vivo.

Às minhas “irmãs” acadêmicas, **Marcia, Paula, Carol e Fernanda**, pela amizade e companheirismo durante esses últimos anos.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia, **Marcelo e Ronaldo**, por todo auxílio prestado.

*Ao meu grande amigo **Mauro**, que mesmo longe tenta me animar quando as coisas não acontecem como eu gostaria.*

*À família **De Lazari** por sempre estarem dispostos a me ajudar, seja com o que for.*

*Ao **LMA-IQ** pelas imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão.*

*Ao **LNLS** pelas medidas de SAXS.*

*A todos os servidores da **Faculdade de Odontologia de Araraquara**.*

*A todos os servidores do **Instituto de Química de Araraquara**.*

*Ao **Instituto de Cerâmica y Vidrio**, pelo suporte físico durante o meu Doutorado Sanduíche.*

*As funcionárias da **Seção de Pós-Graduação** e da **Biblioteca** por todo apoio necessário durante esses anos.*

*À **Capes**, pela bolsa concedida e apoio financeiro durante o doutorado sanduíche (PDSE-Capes).*

*À **Fapesp** pela bolsa concedida e apoio financeiro.*

Chico Xavier contou que, num de seus dias de profunda amargura, solicitou ao benfeitor espiritual que levasse o seu pedido de socorro à Maria de Nazaré, para que ela o consolasse, já que seus problemas eram graves.

Após alguns dias, o benfeitor retornou dizendo-se portador de um recado da mãe de Jesus.

Chico imediatamente pegou papel e lápis e colocou-se na posição de anotar:

“Pode falar, tomarei nota de cada palavra.”

Emmanuel, benfeitor atencioso, lhe falou:

“Anote aí, Chico. Maria me pediu para que trouxesse o seguinte recado:

‘Isso também passará. Ponto final.’”

Chico tomou nota rapidamente e perguntou ao benfeitor: “Só isso?”.

*E ele respondeu: “É, Chico. A Mãe Santíssima pediu para lhe dizer que
isso “também passará.”*

RESUMO

O desenvolvimento de biomateriais que promovam a reparação de tecidos lesionados tem sido objeto de intensa investigação. Em relação à reparação do tecido ósseo, as cerâmicas são materiais muito pesquisados em função de sua ampla possibilidade de uso, inclusive na confecção de pastas cimentícias moldáveis. A sílica mesoporosa apresenta elevada área de superfície específica ($\sim 1000 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) e tamanho de poros usualmente em torno de 2-30 nm, atraindo atenção para aplicações como importantes carreadores de fármacos e proteínas. O peptídeo de crescimento osteogênico (OGP) é um tetradecapeptídeo endógeno, cuja forma ativa atua como agente anabólico e estimulador hematopoiético, promovendo a diferenciação osteoblástica. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um cimento ósseo injetável, reabsorvível e bioativo, com sílica mesoporosa e peptídeo de crescimento osteogênico. O peptídeo foi sintetizado pelo método em fase sólida, purificado por Cromatografia Líquida (HPLC) e caracterizado por Espectrometria de Massas. O material mesoporoso foi sintetizado pela metodologia sol-gel e sua porosidade confirmada por Adsorção-dessorção de N_2 , Espalhamento de Raios X à Baixo Ângulo e Microscopia Eletrônica de Transmissão. Os cimentos foram preparados a partir de sulfato de cálcio (CaS), fosfato de cálcio (CaP) e aluminato de cálcio (CaAl), sem e com sílica mesoporosa, e analisados quanto suas características físico-químicas. Os experimentos *in vitro* foram realizados para avaliar o potencial citotóxico e genotóxico dos cimentos em cultura de células de ovário (CHO-K1) e análise da viabilidade celular e formação da matriz mineralizada em células pré-osteoblasticas (MC3T3-E1). O estudo *in vivo* foi realizado em defeitos ósseos críticos em calvária de ratos e analisado quanto à formação de tecido ósseo, por histomorfometria, e densidade do tecido neoformado, por imagens de raios X. As análises dos cimentos demonstraram que a presença de partículas de sílica mesoporosa promoveu diferentes comportamentos físico-químicos quando comparados aos cimentos sem sílica, como maior razão líquido/pó e, conseqüentemente, maior porosidade e menor resistência mecânica à compressão. Os cimentos CaP e CaAl, sem e com sílica, mostraram bioatividade *in vitro* quando imersos em solução que simula o fluido corpóreo (*Simulated Body Fluid* - SBF). No estudo de liberação do peptídeo OGP, incorporado nas partículas de sílica

mesoporosa pré-misturada aos cimentos, o cimento CaS apresentou maior velocidade de liberação em relação aos cimentos estudados, com 80% do conteúdo peptídico liberado em 24 horas. Em relação à viabilidade celular, os cimentos CaS, com e sem sílica, não foram citotóxicos, mas os cimentos CaP e CaAl, apresentaram citotoxicidade; todavia esse comportamento não comprometeu a proliferação celular e nos ensaios de avaliação da mutagenicidade, os cimentos não promoveram dano celular significativo. Os testes envolvendo células MC3T3-E1 mostraram que a viabilidade celular e a capacidade de formação da matriz mineralizada foram independentes da presença do peptídeo OGP, sendo mais sensível à presença de sílica e ao tempo de tratamento com os meios condicionados. Os resultados do teste in vivo, com os cimentos CaP, com e sem sílica mesoporosa e peptídeo OGP, demonstraram que esses se degradaram e promoveram maior formação óssea durante os primeiros 15 dias pós-cirúrgico, com aproximadamente 30% do defeito preenchido por tecido neoformado, assim como maior densidade nas margens dos defeitos quando comparados com o controle. No entanto, a presença do peptídeo OGP foi significativa somente nos primeiros 30 dias pós-cirúrgico de análise e não houve diferença estatística com o cimento com sílica e sem peptídeo. Além do mais, não houve diferença entre os grupos experimentais e o controle nos períodos mais tardios de análise. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que, dentre os cimentos estudados, aqueles com partículas de sílica mesoporosa e peptídeo OGP são os mais promissores para o reparo do tecido ósseo, principalmente nos períodos iniciais de cicatrização, devido ao seu potencial osteogênico.

Palavras-chave: cimento ósseo; sílica mesoporosa; peptídeo de crescimento osteogênico (OGP); proliferação celular; regeneração óssea.

ABSTRACT

The development of biomaterials that promote repair of injured tissues has been the subject of intense research. Regarding the bone tissue repair, ceramics are one of the most researched biomaterials groups due to its wide possibility of use, including cement pastes with good moldability. The mesoporous silica has high specific surface area ($\sim 1000 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) and pore size usually around 2-30 nm attracting attention for its applications as drugs and proteins carriers. The osteogenic growth peptide (OGP) is an endogenous tetradecapeptide, whose active form acts as an anabolic agent and hematopoietic stimulator, promoting osteoblast differentiation. Thus, the aim of this study was to develop an injectable bone cement, resorbable and bioactive, mesoporous silica and osteogenic growth peptide. The peptide was synthesized by the solid phase method, purified by High Performande Liquid Chromatography (HPLC) and characterized by Mass Spectrometry. The mesoporous materials were synthesized by sol-gel method and its porosity confirmed by Adsorption-desorption of N_2 , Small-angle X-ray Scattering and Transmission Electronic Microscopy. Cements were prepared from calcium sulfate (CaS), calcium phosphate (CaP) and calcium aluminate (CaAl), without and with mesoporous silica, and analyzed for its physicochemical characteristics. In vitro experiments were carried out to evaluate the cements cytotoxic and genotoxic potential in CHO-K1 hamster ovary cell line and analysis of the mineralized matrix formation in MC3T3-E1 osteoblasts cell line. The in vivo study was performed in critical defects in rat calvaria, and it has analyzed as formation of bone tissue by histomorphometry and density of newly formed tissue by X-ray images. The cements analysis have shown that the presence of mesoporous silica particles promoted different physico-chemical behavior when compared to those without silica, such as higher ratio Liquid/Powder, higher porosity and, hence, decreases the mechanical resistance. CaP and CaAl cements showed bioactivity in vitro when immersed in Simulated Body Fluid solution. Concerning OGP liberation, the CaS cement showed the fastest release in the OGP-mesoporous silica-loaded cement release studies, releasing 80% peptide loaded in 24 hours. Regarding cell viability, CaS cements with and without silica, were not cytotoxic, but the CaP and CaAl cement showed cytotoxicity; however this behavior did not affect cell proliferation. And in mutagenicity tests, the cements did not

promote significant cell damage. The tests involving MC3T3-E1 cells showed that cell viability and mineralized matrix formation capacity is independent of the OGP peptide presence and it is more sensitive to the presence of silica and the treatment time with the conditioned culture media. The test in vivo, with CaP cements, with and without mesoporous silica and OGP, demonstrated that these cements have degraded and promoted increased bone formation during the first 15 postoperative days, with approximately 30% of the defect filled by newly formed tissue as well as higher density on the defects borders when compared to the control. However, the presence of OGP peptide was significant only during the first 30 days postoperative, but there was no statistical difference with silica cement and without this peptide. Furthermore, there was no difference between experimental groups and the control in the later study periods. According to the results, it is concluded that, among the cements studied, those with mesoporous silica particles and OGP peptide are the most promising for bone tissue repair, especially in the initial stages of healing due to its osteogenic potential.

Keywords: bone cement; mesoporous silica; osteogenic growth peptide; cell proliferation; bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática do comportamento de um material tipo cimento.	38
Figura 2.	Domínios funcionais no peptídeo OGP. A porção N-terminal compreende o domínio que participa da ligação às OGPBP (α_2M) para regulação da concentração no soro e proteção contra clivagem proteolítica. A porção C-terminal participa do reconhecimento e ligação ao receptor macromolecular, sinalização da via mitogênica e diferenciação dos osteoblastos.	54
Figura 3.	Mecanismo de formação da sílica mesoporosa.	57
Figura 4.	Fluxograma representando resumidamente o trabalho desenvolvido.	63
Figura 5.	Conformação dos corpos-de-prova: preenchimento dos moldes, correção das faces e seleção para os testes de resistência à compressão daqueles que não apresentavam defeitos visíveis.	68
Figura 6.	Imagem e representação esquemática do aparato experimental utilizado para quantificar a injetabilidade dos cimentos.	71
Figura 7.	Imagens dos aparatos experimentais utilizados na liberação do peptídeo OGP-CF através da Espectroscopia de Fluorescência.	78
Figura 8.	Imagem esquemática do sistema fechado para obtenção dos dados da liberação do peptídeo OGP por Espectroscopia de Fluorescência.	78
Figura 9.	Tipos celulares analisados no Teste do Micronúcleo. (A) Células com 1 a 4 núcleos, respectivamente; (B) Célula binucleada com micronúcleo, ponte nucleoplasmática e broto nuclear, respectivamente.	84
Figura 10.	Classificação de danos celular. 0 (sem danos, <5%); 1 (baixo nível de danos, 5-20%); 2 (médio nível de danos, 20-40%); 3 (alto nível de danos, 40-95%); 4 (dano total, >95%).	86
Figura 11.	Típica célula “cometa” mostrando os parâmetros de análise: cabeça e cauda.	86
Figura 12.	Procedimento cirúrgico. (A) tricotomia; (B) incisão com lâmina de bisturi nº 15 sob o osso parietal; (C) perfuração total do osso parietal mantendo-se a integridade da dura-máter; (D) defeito de tamanho crítico (8 mm); (E) sutura através de pontos contínuos com fio Mononylon 3-0.	92
Figura 13.	Imagem esquemática do <i>template</i> utilizado para as análises de densidade através das radiografias da calota dos ratos.	93
Figura 14.	Porcentagem de fechamento do defeito crítico. TO: Tamanho Original do defeito; TR: Tamanho Remanescente do defeito.	96
Figura 15.	Porcentagem de preenchimento ósseo. (A) área de formação óssea (AO) obtida através da soma das áreas onde se observou formação óssea. (B) área total do defeito (AT) foi definida pela multiplicação da espessura do crânio do animal (EC) pelo tamanho total do defeito (TO).	97
Figura 16.	Isoterma de adsorção (quadrado sólido)/dessorção (círculo aberto) de nitrogênio da sílica mesoporosa pura calcinada, obtida a partir de P123.	99
Figura 17.	Representação esquemática da estrutura dos materiais mesoporosos hexagonais.	100
Figura 18.	Difratograma de SAXS da amostra de sílica mesoporosa.	100

Figura 19.	Modelo esquemático mostrando aparente "estrutura lamelar" a partir de uma projeção de um arranjo hexagonal de túbulos.	101
Figura 20.	Imagens de TEM da amostra sílica mesoporosa, perpendicular e paralelo ao eixo dos poros.	102
Figura 21.	Perfis da temperatura de cura em função do tempo para os cimentos CaS e CaSSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.	106
Figura 22.	Perfis da temperatura de cura em função do tempo para os cimentos CaP e CaPSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.	106
Figura 23.	Perfis da temperatura de cura em função do tempo para os cimentos CaAl e CaAlSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.	107
Figura 24.	pH de cura em função do tempo em contato com solução SBF para os cimentos CaS e CaSSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.	108
Figura 25.	pH de cura em função do tempo em contato com solução SBF para os cimentos CaP e CaPSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.	108
Figura 26.	pH de cura em função do tempo em contato com solução SBF para os cimentos CaAl e CaAlSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.	109
Figura 27.	Difratogramas de raios X para os cimentos CaS e CaSSi; as difrações referentes a sulfato de cálcio hemihidratado estão assinaladas por (*).	110
Figura 28.	Difratogramas de raios X de HA em pó antes e após tratamento térmico por 1100°C.	111
Figura 29.	Difratogramas de raios X do pó de β -TCP precursor e dos cimentos CaP e CaPSi após 24 horas em SBF; B=Bruxita, M=Monetita, T= β -TCP.	112
Figura 30.	Difratogramas de raios X do pó do cimento aluminato de cálcio Secar 71 e dos cimentos CaAl e CaAlSi após 24 horas em SBF; CA= CaAl_2O_4 , CA ₂ = CaAl_4O_7 .	113
Figura 31.	Resistência à compressão dos cimentos CaS e CaSSi após 24 horas de cura em imersão.	114
Figura 32.	Resistência à compressão dos cimentos CaP e CaPSi após 1 dia e 7 dias de cura imersos em solução SBF.	115
Figura 33.	Resistência à compressão dos cimentos CaAl e CaAlSi após 1 dia e 7 dias de cura imersos em solução SBF.	116
Figura 34.	Imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaS.	118
Figura 35.	Imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaSSi e a presença de partículas de sílica mesoporosa entre os cristais (em destaque).	118
Figura 36.	Imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaP.	119
Figura 37.	Imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaPSi.	120
Figura 38.	Imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaAl.	121
Figura 39.	Imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaAlSi.	121
Figura 40.	Porosidade aparente dos cimentos com e sem partículas de sílica mesoporosa.	122
Figura 41.	Densidade aparente dos cimentos com e sem partículas de sílica mesoporosa.	123

Figura 42.	Injetabilidade dos cimentos CaS e CaSSi em função do tempo após o início da mistura.	125
Figura 43.	Injetabilidade dos cimentos CaP e CaPSi em função do tempo após o início da mistura.	125
Figura 44.	Injetabilidade dos cimentos CaAl e CaAlSi em função do tempo após o início da mistura.	126
Figura 45.	Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos discos de CaS imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.	128
Figura 46.	Espectro de EDS para o cimento CaS após imersão em solução de SBF por 14 dias.	128
Figura 47.	Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos discos de CaSSi imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.	128
Figura 48.	Espectro de EDS para o cimento CaSSi após imersão em solução de SBF por 14 dias.	129
Figura 49.	Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos discos de CaP imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.	129
Figura 50.	Espectro de EDS para o cimento CaP após imersão em solução de SBF por 14 dias.	130
Figura 51.	Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos discos de CaPSi imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.	130
Figura 52.	Espectro de EDS para o cimento CaP após imersão em solução de SBF por 14 dias.	130
Figura 53.	Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos discos de CaAl imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.	131
Figura 54.	Espectro de EDS para o cimento CaAl após imersão em solução de SBF por 14 dias.	131
Figura 55.	Imagens de SEM das superfícies dos discos de CaAlSi imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.	132
Figura 56.	Espectro de EDS para o cimento CaAl após imersão em solução de SBF por 14 dias.	132
Figura 57.	Degradação e mudanças nos valores de pH dos cimentos CaS e CaSSi após imersão em solução SBF em vários períodos de tempo.	134
Figura 58.	Análise das soluções SBF remanescentes após imersão dos cimentos CaS e CaSSi.	134
Figura 59.	Degradação e mudanças nos valores de pH dos cimentos CaP e CaPSi após imersão em solução SBF em vários períodos de tempo.	135
Figura 60.	Análise das soluções SBF remanescentes após imersão dos cimentos CaP e CaPSi.	136
Figura 61.	Degradação e mudanças nos valores de pH dos cimentos CaAl e CaAlSi após imersão em solução SBF em vários períodos de tempo.	137
Figura 62.	Análise das soluções SBF remanescentes após imersão dos cimentos CaAl e CaAlSi.	137
Figura 63.	Cromatogramas do peptídeo OGP bruto e após purificação.	138
Figura 64.	Espectro de Massas da fração purificada do peptídeo OGP.	139
Figura 65.	Cromatogramas obtidos em escala analítica do peptídeo CF-OGP bruto e purificado.	139
Figura 66.	Espectro de Massas da fração purificada do peptídeo CF-OGP.	140

Figura 67.	Espectros típicos de CD mostrando o perfil característico de α -hélice, folha- β e estrutura desordenada.	141
Figura 68.	Espectro de CD do peptídeo OGP puro e CF-OGP.	141
Figura 69.	Espectro de fluorescência do peptídeo CF-OGP.	142
Figura 70.	Isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio da sílica mesoporosa incorporada com peptídeo OGP.	144
Figura 71.	Perfil de liberação acumulativa de CF-OGP a partir do cimento CaSSi; <i>inset</i> destacando a liberação nas primeiras 24 horas.	145
Figura 72.	Perfis de liberação acumulativa de CF-OGP a partir do cimento CaPSi.	146
Figura 73.	Perfis de liberação acumulativa de CF-OGP a partir do cimento CaAlSi.	146
Figura 74.	Ensaio XTT. As colunas indicam o valor médio de viabilidade celular (%) para os materiais CaS, CaSSi e CaSSi-OGP. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, citotoxicidade baixa ($p < 0,05$; Tukey).	151
Figura 75.	Ensaio XTT. As colunas indicam o valor médio de viabilidade celular (%) para os materiais CaP, CaPSi e CaPSi-OGP. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$; Tukey).	152
Figura 76.	Coloração dos meios de cultura após contato com os cimentos por 24 horas.	153
Figura 77.	Ensaio XTT. As colunas indicam o valor médio de viabilidade celular (%) para os materiais CaAl, CaAlSi e CaAlSi-OGP. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, citotoxicidade leve ($p < 0,05$; Tukey).	155
Figura 78.	Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica dos materiais CaS, CaSSi e CaSSi-OGP e suas respectivas diluições. Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. (*) $p < 0,05$; Tukey).	156
Figura 79.	Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica dos materiais CaP, CaPSi e CaPSi-OGP e suas respectivas diluições. Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. (*) $p < 0,05$; Tukey).	156
Figura 80.	Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica dos materiais CaAl, CaAlSi e CaAlSi-OGP e suas respectivas diluições. Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. (*) $p < 0,05$; Tukey).	157
Figura 81.	Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio cometa dos cimentos CaSSi e CaSSi-OGP. Colunas indicam o valor médio da porcentagem de DNA encontrado na cauda dos nucleóides.	161
Figura 82.	Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa. Colunas indicam o valor médio do <i>Tail Moment</i> para os cimentos CaSSi e CaSSi-OGP.	161
Figura 83.	Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa dos materiais CaSSi e CaSSi-OGP. Colunas indicam o valor médio do Índice de Danos no DNA (IDD) por avaliação visual de danos dos diferentes tratamentos.	162
Figura 84.	Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio cometa dos cimentos CaPSi e CaPSi-OGP. Colunas indicam o valor médio da porcentagem de DNA encontrado na cauda dos nucleóides.	162

Figura 85.	Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa. Colunas indicam o valor médio do <i>Tail Moment</i> dos cimentos CaPSi e CaPSi-OGP.	163
Figura 86.	Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa dos materiais CaPSi e CaPSi-OGP. Colunas indicam o valor médio do Índice de Danos no DNA (IDD) por avaliação visual de danos dos diferentes tratamentos. Barras indicam o erro padrão.	163
Figura 87.	Ensaio de viabilidade celular através do Teste de MTT (A) e Cristal Violeta (B) para os cimentos CaS, CaSSi e CaSSi-OGP, após 24 horas de tratamento.	165
Figura 88.	Ensaio de viabilidade celular através do Teste de MTT (A) e Cristal Violeta (B) para os cimentos CaP, CaPSi e CaPSi-OGP, após 24 horas de tratamento.	166
Figura 89.	Imagens das áreas de formação de matriz calcificada observadas macroscopicamente após tratamento da cultura celular com extratos dos cimentos CaS, CaSSi e CaSSi-OGP nos períodos de 14 e 21 dias.	168
Figura 90.	Imagens das áreas de formação de matriz calcificada observadas macroscopicamente após tratamento da cultura celular com extratos dos cimentos CaP, CaPSi e CaPSi-OGP nos períodos de 14 e 21 dias.	169
Figura 91.	Imagens radiográficas digitais dos grupos experimentais (CaP, CaPSi e CaPSi-OGP) e controle, de acordo com os períodos de análise pós-cirúrgico. O pontilhado vermelho representa aproximadamente a área onde foi realizado o defeito (8mm).	171
Figura 92.	Fotomicrografias de cortes sagitais da calvária de ratos dos grupos Controle, CaP, CaPSi e CaPSi-OGP no período de 15 dias pós-cirúrgico. No aumento de 10x (lado esquerdo), é possível observar o limite das margens do defeito, entre o osso maduro (om) e osso neoformado (on), periosteo (p), osteoblastos (seta) adjacentes ao osso e inúmeros vasos sanguíneos (v). Observa-se em maior aumento (40x, lado direito) o preenchimento do defeito por tecido conjuntivo fibroso formado por feixes de fibras colágenas (fc) e fibroblastos, vasos (v), osteócitos (*) no tecido neoformado, cimento remanescente (c) próximo a células inflamatórias (ci) e células gigantes (**). HE – 10x. HE – 40x.	175
Figura 93.	Fotomicrografias de cortes sagitais da calvária de ratos dos grupos Controle, CaP, CaPSi e CaPSi-OGP no período de 30 dias pós-cirúrgico. No aumento de 10x (lado esquerdo), observa-se o osso maduro (om) e osso neoformado (on) no grupo Controle; nos grupos experimentais mostrou-se mais espesso. O periosteo (p) envolvendo todo o osso da calota, rico em osteoblastos (seta) adjacentes ao osso e também se observa tecido adiposo (tad). Observa-se em maior aumento (40x, lado direito) o preenchimento do defeito por tecido conjuntivo fibroso formado por feixes de fibras colágenas (fc), fibroblastos e vasos (v), osteócitos no tecido ósseo (*), cimento remanescente (c), poucas células inflamatórias e células gigantes (**). HE – 10x. HE – 40x.	176
Figura 94.	Fotomicrografias de cortes sagitais da calvária de ratos dos grupos Controle, CaP, CaPSi e CaPSi-OGP no período de 60 dias pós-cirúrgico. No aumento de 10x (lado esquerdo), observam-se osso maduro (om) e osso neoformado (on), osteoblastos (seta) na camada interna do periosteo (p) e tecido adiposo (tad). Observa-se em maior aumento (40x, lado direito) tecido conjuntivo fibroso formado por feixes de fibras colágenas (fc), fibroblastos e vasos (v), osteócitos (*) no tecido ósseo. No grupo CaP observam-se resquícios de cimento envolvidos pro tecido ósseo e no grupo CaPSi-OGP o cimento está envolto por tecido conjuntivo fibroso (c). HE – 10x. HE – 40x.	177

Figura 95.	Fotomicrografias de cortes sagitais da calvária de ratos dos grupos Controle, CaP, CaPSi e CaPSi-OGP no período de 120 dias pós-cirúrgico. No aumento de 10x (lado esquerdo), observa-se osso neoformado (on) em direção à sutura sagital, perióstio (p) e osteoblastos (seta) adjacentes ao osso. No aumento de 40x observam-se osteócitos (*) no tecido ósseo neoformado, tecido conjuntivo fibroso, rico em fibras colágenas, fibroblastos e inúmeros vasos sanguíneos (v). No grupo CaP há formação óssea junto ao cimento remanescente (c). HE – 10x. HE – 40x.	178
Figura 96.	Área da formação óssea no defeito crítico (%) em função do tempo para os grupos experimentais (CaP, CaPSi e CaPSi-OGP) e controle. (*) representa diferença estatística em relação ao controle.	179
Figura 97.	Reparação do defeito ósseo crítico (%) em função do tempo para os grupos experimentais (CaP, CaPSi e CaPSi-OGP) e controle. (*) representa diferença estatística em relação ao controle.	179

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Fosfatos de cálcio. Fases da apatita, fórmula química e razão molar Ca/P.	43
Tabela 2.	Componentes principais do cimento Secar [®] 71.	51
Tabela 3.	Principais fases minerais do Secar 71. (C=CaO, A=Al ₂ O ₃)	51
Tabela 4.	Composição dos cimentos, componente líquido, porcentagem de sílica e razão L/P.	66
Tabela 5.	Concentração iônica do plasma sanguíneo humano e da solução SBF.	72
Tabela 6.	Divisão dos grupos experimentais de acordo com as concentrações dos extratos para ensaio em cultura celular.	80
Tabela 7.	Divisão dos animais em grupos de acordo com o material.	90
Tabela 8.	Classificação para intensidade de reação inflamatória presente nos espécimes.	95
Tabela 9.	Dados obtidos por SAXS e BET.	101
Tabela 10.	Tempo de final de cura dos cimentos.	104
Tabela 11.	Parâmetros cinéticos de liberação do peptídeo OGP-CF.	147
Tabela 12.	Índice de Divisão Nuclear (IDN), Frequência de Células Binucleadas com Micronúcleo (FBMN) e Frequência de Micronúcleos (FMN), de Pontes Nucleoplasmáticas (PN) e de brotos obtidos para os materiais CaSSi e CaSSi-OGP e respectivas diluições. Valores médios e erro padrão.	158
Tabela 13.	Índice de Divisão Nuclear (IDN), Frequência de Células Binucleadas com Micronúcleo (FBMN) e Frequência de Micronúcleos (FMN), de Pontes Nucleoplasmáticas (PN) e de brotos obtidos para os materiais CaPSi e CaPSi-OGP e respectivas diluições. Valores médios e erro padrão.	159
Tabela 14.	Densidade óssea (mmAl) do osso neoformado na região das margens dos defeitos dos grupos experimentais CaP, CaPSi e CaPSi-OGP e controle, segundo os períodos de análise pós-cirúrgicos. (*) representa diferença estatística em relação ao controle (p<0,05).	171

LISTA DE ABREVIATURAS

1. Aminoácidos

Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Phe (F)	Fenilalanina
Gly (G)	Glicina
Gln (Q)	Glutamina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Pro (P)	Prolina
Tyr (Y)	Tirosina
Thr (T)	Treonina

2. Outras

α2-M	Macroglobulina α
ALP	Fosfatase Alcalina
ASPM	American Society for Testing and Materials
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BMC	Conteúdo Mineral Ósseo (Bone Mineral Content)
BMD	Densidade Mineral Óssea (Bone Mineral Density)
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BSA	Albumina Bovina
CaAl	Cimento Experimental de Aluminato de Cálcio
CaAls	Grupo de cimentos experimentais a base de aluminato de cálcio, aluminato de cálcio com sílica e aluminato de cálcio com sílica e peptídeo OGP
CaAlSi	Cimento Experimental de Aluminato de Cálcio com Sílica
CaAlSi-OGP	Cimento Experimental de Aluminato de Cálcio com Sílica e Peptídeo OGP
CAC	Cimento de Aluminato de Cálcio
CaP	Cimento Experimental de Fosfato de Cálcio

CaPs	Grupo de cimentos experimentais a base de fosfato de cálcio, fosfato de cálcio com sílica e fosfato de cálcio com sílica e peptídeo OGP
CaPSi	Cimento Experimental de Fosfato de Cálcio com Sílica
CaPSi-OGP	Cimento Experimental de Fosfato de Cálcio com Sílica e Peptídeo OGP
CaS	Cimento Experimental de Sulfato de Cálcio
CaSs	Grupo de cimentos experimentais a base de sulfato de cálcio; sulfato de cálcio com sílica; e sulfato de cálcio com sílica e peptídeo OGP
CaSSi	Cimento Experimental de Sulfato de Cálcio com Sílica
CaSSi-OGP	Cimento Experimental de Sulfato de Cálcio com Sílica e Peptídeo OGP
CD	Dicloísmo Circular
CDHA	Hidroxiapatita Deficiente em Cálcio
CF	5,6-Carboxifluoresceína
CF-OGP	Osteogenic Growth Peptide marcado do 5,6-carboxifluoresceína
CMC	Carboximetilcelulose
CN	Controle Negativo
COL-2	Colágeno Tipo II
CP	Controle Positivo
CPC	Cimento de Fosfato de Cálcio
DCM	Diclorometano
DCPA	Fosfato Dicálcio Anidro
DIC	N,N-Diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPCD	Fosfato Dicálcio Dihidratado
EDS	Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X
ES-MS	Espectrometria de Massa
FBMN	Frequência de Micronúcleos
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonila
FN-1	Fibronectina 1
FS	Espectroscopia de Fluorescência

F-ST	Final Setting Time (Tempo Final de Cura)
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e Eosina
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	High Performande Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
ICDD	International Centre for Diffraction Data
ICP	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
IDD	Índice de Dano no DNA
IDN	Índice de Divisão Nuclear
IGF	Fator de Crescimento Semelhante á Insulina
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
ISO	International Organization for Standardization
I-ST	Initial Setting Time (Tempo Inicial de Cura)
MCPM	Diidrogenofosfato de Cálcio Monohidratado
MN	Micronúcleo
MTA	Mineral Trioxide Aggregate (Agregado de Trióxido Mineral)
MTS	Micelle Template Structures (Estruturas Moldadas por Micelas)
OGP	Osteogenic Growth Peptide (Peptídeo de crescimento osteogênico)
OGP-BP	Proteínas Ligantes do Peptídeo de Crescimento Osteogênico
P123	Pluronic 123
PBS	Solução Tampão Fosfato
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PEG	Polietilenoglicol
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PMMA	Poli-Metil-Metacrilato
rMSC	Célula Tronco Mesequimal de Rato
SAXS	Espalhamento de Raios X à Baixo Ângulo
SBA-15	Santa Barbara Amorphous Number 15
SBF	Simulated Body Fluid (Fluido Corpóreo Simulado)
SFB	Soro Fetal Bovino
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

ST	Setting Time (Tempo de Cura)
t-Bu	t-butílico
TCP	Fosfato tricálcico
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TEOS	Tetraetilortosilicato
TGF	Fator de Crescimento Transformador
TFA	Ácido Trifluoracético
Tris	Tris(hidroximetil)metilamina
UV-Vis	Ultravioleta-visível
XRD	Difração de Raios X

Sumário

1. INTRODUÇÃO	30
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1. De Biomateriais a cimentos ósseos	33
2.2. Cimentos de Sulfato de Cálcio	40
2.3. Cimentos de Fosfato de Cálcio	43
2.4. Cimentos de Aluminato de Cálcio	48
2.5. Peptídeo de Crescimento Osteogênico (<i>Osteogenic Growth Peptide</i>)	52
2.6. Sílica Mesoporosa.....	56
3. OBJETIVOS	63
4. MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1. Síntese de partículas de sílica mesoporosa	64
4.1.1. Caracterização.....	64
<i>Medidas de porosidade e de superfície específica (BET)</i>	64
<i>Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)</i>	64
<i>Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)</i>	65
4.2. Preparação e caracterização dos cimentos	65
<i>Testes de manipulação dos cimentos</i>	65
4.2.1. Caracterização.....	66
<i>Tempo, temperatura e pH de cura</i>	66
<i>Difração de Raios X (XRD)</i>	67
<i>Medidas de Resistência à Compressão</i>	67
<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)</i>	69
<i>Densidade e Porosidade Aparente</i>	69
<i>Injetabilidade</i>	70
<i>Bioatividade e Degradação in vitro em solução SBF</i>	71
4.3. Síntese do peptídeo OGP e OGP-CF em Fase Sólida	73

4.3.1. Purificação	75
<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</i>	75
4.3.2. Caracterização.....	76
<i>Espectrometria de massas (MS)</i>	76
<i>Dicroísmo Circular (CD)</i>	76
4.4. Incorporação do peptídeo CF-OGP nas partículas de sílica mesoporosa	77
4.5. Estudo da liberação de CF-OGP em solução de SBF a partir dos cimentos	77
4.6. Testes in vitro – Cultura celular CHO-K1	79
<i>Preparação dos cimentos</i>	79
<i>Preparo dos meios de cultura condicionados</i>	79
<i>Cultura Celular</i>	79
<i>Ensaio de Citotoxicidade (XTT)</i>	80
<i>Ensaio de Sobrevivência Clonogênica</i>	81
<i>Ensaio de Mutagenicidade – Teste Micronúcleo</i>	82
<i>Ensaio de Genotoxicidade – Teste Cometa</i>	84
4.7. Testes in vitro – Cultura celular MC3T3-E1	86
<i>Preparação dos cimentos</i>	86
<i>Preparo dos meios de cultura condicionados</i>	87
<i>Cultura Celular</i>	87
<i>Análise da viabilidade celular</i>	88
<i>Ensaio de mineralização in vitro</i>	89
<i>Análise estatística</i>	89
4.8. Testes in vivo	89
<i>Preparação do cimento</i>	90
<i>Procedimento cirúrgico</i>	90
<i>Análise radiográfica dos espécimes ex vivo</i>	93

<i>Processamento histotécnico</i>	94
<i>Análise Histomorfométrica</i>	95
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
5.1. Caracterização das partículas de sílica	98
5.2. Caracterização dos cimentos cerâmicos com e sem partículas de sílica mesoporosa	102
<i>Testes de manipulação dos cimentos</i>	102
<i>Tempo, temperatura e pH de cura</i>	104
<i>Difração de Raios X</i>	109
<i>Medidas de Resistência à Compressão</i>	113
<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	117
<i>Densidade e Porosidade Aparente</i>	121
<i>Injetabilidade</i>	124
<i>Bioatividade e Degradação in vitro em solução SBF</i>	127
5.3. Síntese, purificação e caracterização do peptídeo OGP e CF-OGP	138
5.4. Incorporação às partículas de sílica mesoporosa e estudo da liberação de CF-OGP em solução de SBF a partir dos cimentos	142
5.5. Análises in vitro	150
5.5.1. Cultura Celular CHO-K1	150
<i>Ensaio de Citotoxicidade</i>	150
<i>Ensaio de Sobrevivência Clonogênica</i>	155
<i>Ensaio de Mutagenicidade</i>	157
<i>Ensaio de Genotoxicidade</i>	160
5.5.2. Cultura Celular MC3T3-E1	164
<i>Viabilidade Celular</i>	164
<i>Mineralização in vitro</i>	167
5.6. Análises in vivo	170

<i>Análise Radiográfica e Histomorfométrica</i>	<i>170</i>
6. CONCLUSÕES	187
7. PERSPECTIVAS.....	189
REFERÊNCIAS	190
 ANEXO 1.....	 219
ANEXO 2.....	220

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida e interesse na sua qualidade têm estimulado o desenvolvimento de novos biomateriais e tecnologias para várias aplicações clínicas, principalmente para implantes. Assim, a perda de um órgão ou de um tecido, devido a uma lesão, tumor ou outros danos, é um problema relevante na saúde humana. Transplante de órgãos ou tecidos é uma terapia padrão para o tratamento destas lesões; no entanto, existem limitações dessa técnica, como exemplo, a falta de doadores compatíveis ou quantidade insuficiente de tecido do doador. Embora o uso de auto-enxertos ósseos represente o “padrão ouro” no tratamento de defeitos ósseos, devido às suas propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas, há desvantagens, como quantidade e áreas doadoras limitadas, alta morbidade da área doadora e tempo cirúrgico adicional (SASKA et al., 2015).

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa compreendem um campo interdisciplinar emergente que incluem terapias celulares, uso de materiais porosos e bioativos no desenvolvimento de substitutos funcionais para o reparo ou substituição de tecidos ou órgãos injuriados (LANGER; VACANTI, 1993). O princípio básico desta terapia é tentar mimetizar a regeneração dos tecidos, restabelecendo sua estrutura e função para obter resultados mais previsíveis e abranger os mais diversos pacientes de forma rápida e com menos dor.

O desenvolvimento de biomateriais que promovam a reparação de tecidos vivos lesionados visando o rápido restabelecimento de suas funções fisiológicas tem sido objeto de intensa e crescente investigação no mundo (KOKUBO, 2008). Em se tratando de reparação, ou mesmo reposição de partes do tecido ósseo, as cerâmicas têm sido uma das classes de materiais mais pesquisadas em função de sua ampla possibilidade de uso, que se estende desde o emprego isolado do material, que pode ser processado sob diferentes técnicas e formas, até o recobrimento de próteses metálicas e configurações de sistemas híbridos a partir de sua associação com polímeros naturais e sintéticos (KOKUBO, 2008; VALLET-REGI

et al., 2008) ou mesmo na confecção de pastas cimentícias moldáveis (MOREJON-ALONSO; CARRODEGUAS; SANTOS, 2012).

Um cimento consiste de um pó e um líquido que, após serem misturados, formam uma pasta moldável e em um determinado período de tempo, perde a plasticidade e ganha cada vez mais consistência.

Os cimentos de uso clínico podem se adaptar a superfície irregular em uma fratura óssea (GINEBRA et al., 1997), como por exemplo, na fixação de próteses atuando como homogeneizador e atenuador de tensões mecânicas, principalmente as de compressão. Os cimentos biocerâmicos têm sido estudados, pois além de fornecerem um apoio físico para a reparação do defeito, ainda são biocompatíveis e osteocondutores, e podem induzir a osteointegração (ABERG et al, 2011; WANG et al., 2014).

A aplicação clínica dos cimentos é determinada por fatores como tempo de cura e resistência mecânica. O tempo de cura é o período em que a massa de cimento é processada e modelada, sem quaisquer efeitos prejudiciais sobre as propriedades do cimento final, até o momento em que o cimento se torne endurecido o suficiente para ser trabalhado sem danificar a estrutura (DRIESSENS et al., 2007). Além disso, muitas formulações podem apresentar baixa resistência mecânica, que pode estar relacionado ao volume do componente líquido e a porosidade do material final. Assim, cimentos com resistência mecânica próxima a dos ossos e com tempos de cura menores, aumentaria o campo de aplicações desses materiais, atualmente focado em reparos crâniofaciais e vertebroplastia.

Além de promover suporte mecânico ou estrutural ao defeito ósseo, os cimentos também podem atuar como um sistema de liberação de uma variedade de moléculas de interesse farmacêutico, aumentando a eficácia do material na reparação óssea.

A eficácia do desempenho das moléculas ativas não é apenas dependente de sua atividade, mas também influenciada pelo método de liberação, ou seja, o material carreador (WOO et al., 2001). Carreadores aumentam a retenção dessas moléculas no local do tratamento por um tempo suficiente para permitir a atividade e, posteriormente, pode fornecer uma base para o crescimento ósseo. É nesse contexto que se destaca as propriedades dos materiais mesoporosos, que possuem

grande área de superfície e poros ordenados (ZHAO, D. et al., 1998). Para aplicações em sistemas carreadores de fármacos, o desenvolvimento de materiais mesoporosos oferece novas possibilidades para incorporar agentes biológicos dentro das suas partículas, seguido pela liberação controlada desses agentes da matriz devido à estrutura organizada (SOUSA, SOUZA, SOUSA, 2008; ARCOS et al., 2009; MANZANO et al., 2011). A partir da descoberta do biovidro (Bioglass[®]) (HENCH et al., 1971), muitos estudos de bioatividade foram realizados em sistemas contendo sílica e fluídos fisiológicos (PEREIRA; CLARK; HENCH, 1995; VALLET-REGÍ et al., 2000), comprovando que a presença de grupos silanóis atuam como sítios de nucleação para o crescimento de cristais de hidroxiapatita (HA) quando imersos nesses fluídos. Assim, a porosidade da sílica mesoporosa pode hospedar uma variedade de moléculas, como anti-inflamatórios, antibióticos, proteínas e peptídeos, e ainda promover a bioatividade.

Dentre as moléculas que podem ser carreadas pelos cimentos, os peptídeos sintéticos surgem como uma alternativa interessante já que, além do amplo espectro de atividade e pela facilidade de reconhecimento e ligação aos sítios específicos das proteínas da matriz extracelular, podem ser utilizados em combinação com outros fármacos. Em se tratando de peptídeos que atuam na regeneração óssea, se destaca o *Osteogenic Growth Peptide* (OGP), um tetradecapeptídeo endógeno fisiologicamente presente em concentrações micromolares no sangue (BAB et al., 1992) que se apresentou como agente anabólico e estimulador hematopoiético (BAB; CHOREV, 2002; GABET et al., 2004).

Desta forma, torna-se interessante a combinação da plasticidade dos cimentos biocerâmicos e sílica mesoporosa por promover, em um mesmo material, biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade, com efeito terapêutico adicional através da incorporação de moléculas específicas, como o peptídeo OGP, para aplicação na reparação do tecido ósseo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. De Biomateriais a cimentos ósseos

O aumento da expectativa de vida e consequente aumento da população idosa, aliado ao aumento de acidentes automobilísticos e de trabalho é um grande estímulo para que a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa desenvolvam substitutos funcionais para o reparo ou substituição de tecidos ou órgãos injuriados.

A literatura descreve que os primeiros implantes datam de 600 d.C. encontrados em um fragmento de mandíbula de origem Maia, onde três conchas foram implantadas em substituição a três incisivos inferiores que haviam sido perdidos (RING, 1995). Os primeiros pensamentos documentados sobre cranioplastia são atribuídos ao médico e anatomista Gabriele Falloppio, no século XVII, que sugeriu o uso de placas de ouro como um material substituto do osso em casos de rompimento da dura-máter (SANTOS, 2002). E desde então, tem-se buscado materiais com composições diversas para a substituição e/ou reparo de tecido ósseo lesado como uma alternativa aos enxertos autógenos.

Atualmente os materiais utilizados como enxertos ósseos são classificados em (PINTO et al., 2007):

- Autógeno: aqueles obtidos do próprio indivíduo. São os únicos entre os tipos de enxerto ósseo a fornecer células ósseas vivas imunocompatíveis. Os enxertos autógenos podem ser obtidos de diferentes regiões do corpo, sendo a crista ilíaca (enxertos ósseos esponjoso-medulares), a calota craniana, a tíbia, as costelas e a mandíbula (especialmente para enxertos de menores proporções) as áreas doadoras de preferenciais.
- Alógeno: aqueles obtidos de outro indivíduo da mesma espécie. Em geral, os indivíduos são diferentes geneticamente, assim os tecidos ósseos substituintes são rotineiramente tratados para reduzir a antigenicidade. A atuação desses substituintes ósseos na osteogênese é puramente passiva, somente oferecem uma matriz de tecido duro.

- Xenógeno: aqueles retirados de uma espécie e transplantados em outra. As diferenças antigênicas desses enxertos são mais pronunciadas do que no osso alo gênico, exigindo um tratamento mais vigoroso para se prevenir contaminação. O exemplo mais comum empregado é o enxerto ósseo bovino liofilizado.
- Aloplásticos: são materiais estudados e utilizados pela engenharia tecidual para a substituição ou reparo de tecidos duros, onde se destacam os metálicos, cerâmicos e poliméricos ou combinações entre eles, conhecidos como biomateriais.

A definição de biomateriais mais aceita é a da Conferência do Instituto de Desenvolvimento de Consenso em Saúde de 1982, que conceitua biomaterial como qualquer substância ou combinação destas, que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que pode ser usado por qualquer que seja o intervalo de tempo, aumentando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do organismo, com a finalidade de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo (WILLIAMS, 2009).

Para que um material seja aceito clinicamente como material de implante, precisa atender a alguns requisitos, como:

- ser biocompatível: o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios, ou seja, não deve causar efeitos nocivos no local do implante ou no sistema biológico.
- ser biofuncional: o material deve ter as características adequadas para cumprir a função desejada pelo tempo determinado.
- ser esterilizável: ou passível de esterilização.

Inicialmente, a atenção era voltada para o desenvolvimento de materiais estáveis, ou seja, que promovessem uma mínima ou nenhuma reação do tecido. Porém com o aumento do conhecimento em biomateriais e resposta fisiológica frente a eles, a tendência foi desenvolver materiais que interagissem com os tecidos, promovendo reações para o seu restabelecimento.

De acordo com a resposta entre o biomaterial e o tecido hospedeiro, estes podem ser classificados em (DE AZA; DE AZA; DE AZA, 2005; HENCH et al., 1971; HENCH; WILSON, 1993; KAWASHI et al., 2000):

- Biotoleráveis: como o próprio nome diz, são materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através da formação de uma camada de tecido fibroso, onde quanto maior a espessura dessa camada, menor a tolerância dos tecidos ao material.
- Bioativos: materiais que promovem ligações de natureza química na interface implante/osso, o que favorece a osteointegração, devido à formação de uma camada de apatita na superfície do material, quando em contato com o fluido fisiológico.
- Bioinertes: materiais também tolerados pelo organismo, mas, ao contrário dos biotoleráveis, a formação do envoltório fibroso é mínima e em alguns casos é praticamente imperceptível.
- Reabsorvíveis: materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, são degradados, solubilizados ou fagocitados e substituídos por tecidos.

Segundo Hing, Wilson e Buckland (2007), o fracasso ou o sucesso de um material para preenchimento ou substituição óssea pode estar relacionado à reabsorção do mesmo, como também à capacidade regenerativa do tecido ósseo; esse processo pode se dar de três formas: a persistência insuficiente do material para promover a aposição óssea e permitir a osteocondutividade; a desestabilização precoce da aposição óssea com a deterioração completa do material, e uma resposta inflamatória exacerbada frente à degradação do material. Em relação à taxa de biodegradação, deve ser adequada à velocidade com a qual os tecidos são reconstruídos.

Ao contrário de outros tecidos, o osso tem a capacidade única de se regenerar completamente. Os fatores limitantes são a manutenção de espaço e estrutura para a formação óssea. Os materiais de enxertia óssea têm sido utilizados para facilitar a formação de osso dentro de um determinado espaço. Os mecanismos biológicos que suportam o uso de materiais para enxertos ósseos são osteogênese, osteoindução e osteocondução.

A osteogênese refere-se à formação ou ao desenvolvimento de novo osso por células contidas no implante. A quantidade de regeneração óssea durante essa fase depende da quantidade de células ósseas transplantadas que resistem ao

procedimento de implante. A osteoindução é um processo químico onde as moléculas contidas no enxerto induzem a conversão das células adjacentes em osteoblastos, ou seja, promovem a diferenciação celular. A osteocondução é um efeito físico, através do qual a matriz do implante forma um arcabouço que favorece a penetração das células ósseas progenitoras externas ao implante, atuando como um elo de ligação para a formação de um novo osso (NEWMAN et al., 2011).

Os auto-enxertos ósseos caracterizam o implante cirúrgico ideal, pois possuem simultaneamente essas três propriedades biológicas necessárias para a formação de osso novo. Entretanto, os enxertos autógenos mostram limitações quanto à quantidade disponível dependendo das condições do paciente, a necessidade de uma cirurgia no sítio doador e o risco de morbidade deste local (ARCOS; VALLET-REGÍ, 2013).

Após a perda de osso, devido a um trauma, infecção ou tumor, o defeito formado geralmente é irregular e seu tamanho é difícil de prever antes da cirurgia. O osso tem capacidade de restabelecer pequenos defeitos através da formação de osso novo em resposta à lesão. No entanto, o mesmo não ocorre em defeitos de dimensões críticas, que devem ser preenchidos com um material adequado para conferir estabilidade ao local (SPICER et al., 2012).

Em se tratando de materiais para o reparo ou substituição do tecido ósseo, as biocerâmicas, que compreendem as cerâmicas, os vidros e as vitrocerâmicas, têm sido utilizadas há mais de um século em aplicações na área da saúde, como por exemplo, olhos de vidros, instrumentos de medidas e diagnósticos, mas há cerca de 30 anos como aplicação intracorpórea (PEREIRA; VASCONCELOS; ZAVAGLIA, 2006).

As biocerâmicas, que são as cerâmicas, vitrocerâmicas e vidros biológicos, têm sido pesquisadas em função de sua ampla possibilidade de uso, que se estende desde o emprego isolado do material, *pellets* ou grânulos, que podem ser processados sob diferentes técnicas e apresentações, até o revestimento de próteses metálicas (KNABE et al., 2004) e configurações de sistemas híbridos a partir de sua associação com polímeros naturais e sintéticos (KOKUBO, 2008; VALLET-REGÍ et al., 2008) ou mesmo na confecção de pastas de cimento moldáveis (MOREJON-ALONSO; CARRODEGUAS; SANTOS, 2012).

O estudo dos pastas cerâmicas é motivado pela sua biocompatibilidade e também pela possível reabsorção e têm sido utilizados como enxerto ósseo com um percentual de sucesso nos últimos anos.

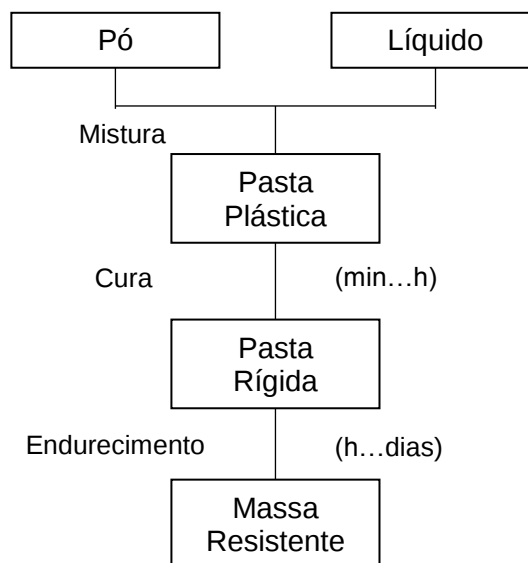
Os cimentos podem ter a mesma composição dos grânulos cerâmicos, preenchendo o defeito completamente e endurecendo para promover funções mecânicas e biológicas (CARRODEGUAS, 2000). Combinando a capacidade de adaptação perfeita da pasta de cimento com propriedades bioativas, pode-se obter um material que promova uma ligação estável com o defeito, acelerando o processo de reparação.

Um cimento hidráulico consiste de um componente sólido capaz de formar uma pasta plástica quando misturado com água ou uma solução aquosa (CARRODEGUAS, 2000). Ao longo de um determinado período de tempo, que poderá ir de alguns minutos a várias horas, esta pasta perde a plasticidade e ganha cada vez mais consistência. Este momento pode ser definido como tempo de cura (*setting time*, ST), pela obtenção de uma pasta rígida. Assim, progressivamente, ocorre o aumento da resistência mecânica em função do tempo, alcançando seu valor máximo, que poderá ser de horas a dias, com a obtenção de uma massa resistente.

O mecanismo pelo qual ocorrem essas mudanças pode variar de um cimento para outro. A formação de um corpo sólido a partir da mistura de um pó e um líquido está resumida na Figura 1.

A cura e endurecimento do cimento são resultados de uma reação química que pode ser de dissolução, precipitação ou hidrólise (CARRODEGUAS, 2000). A cura é identificada como certo estágio coloidal durante o desenvolvimento da rede cristalina, inicialmente fraca e viscosa, enquanto o processo de endurecimento denota o desenvolvimento de uma estrutura cristalina mais forte e irreversível. O tempo durante o qual a pasta de cimento se comporta de forma tixotrópica, ou seja, o tempo necessário para que a pasta alcance uma viscosidade de equilíbrio, denominado tempo de cura, está relacionado ao tempo disponível para se preparar e fazer a colocação definitiva do cimento e pode ser influenciado pela composição do cimento, razão líquido/pó, tamanho de partículas e temperatura.

Figura 1. Representação esquemática do comportamento de um material tipo cimento.



Fonte: Adaptado de Driessens et al. (1997).

Do ponto de vista clínico, há certos requisitos que um cimento ósseo deve cumprir. Esses requisitos são (LEMAITRE; MIRTCHI; MORTIER, 1987; DRIESSENS et al., 1997; CARRODEGUAS et al., 1999):

1. Curar e endurecer *in vivo* em um período de tempo razoável, o qual permita a manipulação adequada do cimento (tempo inicial de cura, I-ST, ≥ 5 minutos; tempo final de cura, F-ST, ≤ 20 minutos);
2. Possuir resistência mecânica apropriada durante o período requerido;
3. Fácil manipulação;
4. Aderir ao tecido duro;
5. Não deve possuir características alergênicas ou cancerígenas;
6. Não deve produzir calor durante a cura;
7. O pH durante e depois da cura deve ser similar ao fisiológico, para evitar efeitos citotóxicos ($6,5 \leq \text{pH} \leq 8,5$).

Dentre as vantagens na aplicação de um cimento ósseo encontram-se a capacidade de promover um encaixe ajustável na fixação de prótese e o aumento da

resistência a cargas da prótese ao distribuir uniformemente as tensões entre a prótese e o osso (PASCUAL et al., 1996).

Os cimentos para aplicações odontológicas são utilizados desde 1870. Esses cimentos, a base de silicato, apresentam excelentes propriedades, como cor, translucidez e terapêuticas, com ação anticariogênica devido aos fluoretos presentes na composição (SANTOS, 2002).

Na ortopedia, um dos cimentos mais popularizados para preenchimento ósseo é o poli metacrilato de metila (PMMA) e suas variações, utilizado principalmente na fixação de próteses e vertebroplastia, com adição de sulfato de bário como agente radiopaco, desde 1940 (CHANRLEY, 1970), embora não devesse ser chamado de cimento, visto que sua reação de cura não envolve reações de hidratação. Esse material possui algumas limitações, como a possibilidade de causar necrose do tecido ao redor do defeito, devido à reação fortemente exotérmica decorrente da sua polimerização, o que também pode levar a redução na resistência mecânica do material (SANTOS et al., 2002). Além do mais, esse material não induz qualquer tipo de remodelação óssea, pois não é um material bioativo (ENGQVIST et al., 2008). Nesse contexto, cimentos ósseos de materiais bioativos tem sido alvo de inúmeros trabalhos de pesquisa, devido a sua menor probabilidade de causarem reações negativas por parte do tecido vivo.

O cimento mais conhecido por sua extensa aplicação na construção e engenharia civil é o cimento Portland. Ele se constitui principalmente de uma mistura de clínquer e de adições, que podem variar de um tipo de cimento para outro e são o que definem os diferentes tipos. O clínquer é o principal componente e está presente em todos os tipos de cimento Portland; tem como matérias-primas o calcário e a argila (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CIMENTO PORTLAND, 2003), fontes de silicato tricálcico $[(\text{CaO})_3\text{SiO}_2]$ e silicato dicálcico $[(\text{CaO})_2\text{SiO}_2]$. O sulfato de cálcio diidratado é uma das adições, que pode ser adicionado na moagem final do cimento, tendo como função básica controlar o tempo de cura. O produto da reação de cura é um material microporoso com poros capilares interconectados (ROY, 1987). Embora não seja um material de uso clínico direto, esse cimento possui basicamente os mesmos componentes químicos do Agregado de Trióxido Mineral (*Mineral Trioxide Aggregate*, MTA), muito utilizado na odontologia como cimento retrobturador. Os estudos mostram interessantes resultados in vitro, como a formação de matriz

mineralizada (SAIDON et al., 2003; GALLEGO-PEREZ et al., 2011), e in vivo como agente capeador pulpar (CAMILLERI et al., 2006; FORNETTI et al., 2009) e biocompatibilidade, descrita tanto no subcutâneo (HOLLAND et al., 2001) quanto em calotas de ratos (SIMÕES et al., 2010).

Muitos cimentos inorgânicos têm sido utilizados para o aumentar a formação de tecidos duros. Os cimentos mais usados como substitutos ósseos são formados a partir de sulfatos de cálcio, fosfatos de cálcio e aluminatos de cálcio.

2.2. Cimentos de Sulfato de Cálcio

O sulfato de cálcio, também conhecido como gesso de Paris (*Plaster of Paris*), é um dos biomateriais reabsorvíveis usados para preenchimento de cavidades ósseas mais antigas, desde a sua primeira utilização in vivo em 1892 por Dressman para tratar osteomielite tuberculosa (PRYOR et al., 2009).

Um típico cimento de sulfato de cálcio consiste de pó de sulfato de cálcio hemiidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$), que reage com água para formar o sulfato de cálcio diidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (THOMAS; PULEO, 2009).

Na década de 1950, Peltier e seus colaboradores (1957) demonstraram a utilização de sulfato de cálcio para reparar grandes defeitos ósseos em tíbia de cães. A área tratada exibiu nova formação óssea e foi demonstrado que o sulfato de cálcio é parcialmente ou completamente reabsorvido, sem nenhuma reação provocada por corpo estranho, indicando ser bem tolerado pelos tecidos in vivo. Peltier e Jones (1978) utilizaram sulfato de cálcio para preencher cavidades formadas pela remoção de cistos ósseos e observaram que o sulfato de cálcio foi absorvido e substituído por um novo osso, com efeitos colaterais mínimos relatados.

A partir de então muitos estudos clínicos foram realizados e vários resultados foram apresentados comprovando que o sulfato de cálcio é biocompatível, com ótimas propriedades regenerativas e angiogênicas (WALSH et al., 2003; SCARANO et al., 2007; URBAN et al., 2007), e ainda osteocondutor, atuando como *scaffold* para a formação de osso novo, e reabsorvível, não necessitando ser removido após a

implantação devido a sua biodegradabilidade (PELTIER, 1961; TURNER et al., 2005).

Na área odontológica, Lebourg e Biou (1961) implantaram sulfato de cálcio em alvéolos após extração dos terceiros molares inclusos, como em outros defeitos ósseos na mandíbula e maxila. Após três a quatro semanas foi observado que o material tinha sido completamente reabsorvido, diminuindo o tempo de reparação óssea nas áreas tratadas, em comparação ao controle. Os autores concluíram que o sulfato de cálcio era um material favorável para o tratamento de defeitos do osso devido à capacidade do material fornecer íons inorgânicos essenciais para o processo de reparação.

O uso de sulfato de cálcio em forma de pasta na elevação do seio maxilar permitiu a integração do tecido ósseo com os implantes e promoveu a formação de tecido com uma maior densidade óssea (DE LEONARDIS; PECORA, 2000). Além disso, observou-se osso lamelar em contato com a superfície do implante, a interface totalmente preenchida e livre de espaços, células epiteliais ou tecido conjuntivo, assim como nenhuma evidência de sulfato de cálcio residual em um estudo com implante provisório (IEZZI et al., 2007).

Estudos clínicos mostraram resultados positivos em relação à utilização de sulfato de cálcio, como preenchimento e barreira, para a preservação do rebordo alveolar pós-extração, proporcionando uma barreira que estabiliza o coágulo, auxiliando na regeneração da área a receber o implante. O uso conjunto de sulfato de cálcio hemihidratado e osso liofilizado desmineralizado aumentou a qualidade e quantidade da formação de osso novo, em alvéolos de extração e defeitos periodontais (SOTTOSANTI, 1993; ANSON, 1996). Estudos clínicos e histológicos desta combinação de materiais para elevação do seio maxilar mostraram que os implantes tinham boa estabilidade e foi encontrado osso desmineralizado remanescente (ANDREANA et al., 2004). Vance e colaboradores (2004) usaram um cimento constituído de sulfato de cálcio hemihidratado e carboximetilcelulose para preservar as dimensões do rebordo alveolar em dentes extraídos e verificou a formação de osso vital na área enxertada.

Em 2001, Kelly e colaboradores publicaram os resultados obtidos com o uso do Osteoset[®], um sulfato de cálcio de uso cirúrgico para preenchimento de defeitos ósseos causados por tumores benignos, traumas, cistos e outros casos, em 109

pacientes. Após 6 meses, os resultados mostraram que aproximadamente 99% do sulfato de cálcio havia sido reabsorvido e 88% dos defeitos haviam sido preenchidos com osso trabecular. Desta forma concluíram que o uso do sulfato de cálcio é seguro e promissor para uso em preenchimentos de defeitos ósseos.

Em um estudo *in vitro*, células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 foram subcultivadas sobre discos formados a partir de cimento de sulfato de cálcio já secos, sulfato de cálcio mineral e PMMA. Após 15 dias, a atividade da fosfatase alcalina (ALP) medida a partir do sobrenadante foi significativamente maior nas amostras de sulfato de cálcio em discos e houve a expressão de colágeno tipo II (COL2) e fibronectina 1 (FN1), genes importantes na formação óssea (LAZÁRY et al., 2007). Esses resultados podem estar associados à forma como os inúmeros pequenos cristais, formados a partir da hidratação do sulfato de cálcio hemiidratado, estão dispostos na superfície dos discos que podem ser utilizados pelas células para a proliferação e produção de matriz óssea (LAZÁRY et al., 2007). *In vivo*, defeitos tratados com sulfato de cálcio mostraram adesão de células osteoblásticas (SIDQUI et al., 1995), formação de novos vasos sanguíneos (BLAHA, 1998) e a presença de proteínas morfogenéticas ósseas (*Bone Morphogenetic Protein*, BMP), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) em comparação com o controle não tratado (WALSH et al., 2003).

A reabsorção de sulfato de cálcio permite a liberação de moléculas no local implantado, como antibióticos (RAUSCHMANN et al., 2005; SANICOLA; ALBERT, 2005; KANELAKOPOULOU et al., 2009) e proteínas (ZHANG, J. et al., 2014).

Ferguson e colaboradores (2014) avaliaram a aplicação do Osteoset[®] T, um sulfato de cálcio hemiidratado em forma de *pellet* contendo 4% do antibiótico tobramicina, no tratamento de osteomielite crônica. Os resultados mostraram que quanto maior a taxa de dissolução do material, maior o nível de fármaco liberado. Tem sido sugerido que a eficácia de sulfato de cálcio que contém tobramicina é equivalente ao PMMA impregnado com o mesmo antibiótico (MCKNEE et al., 2010).

Kumar e colaboradores (2013) observaram a atuação de cimentos de sulfato de cálcio com ceftriaxona, um antibiótico sensível tanto a bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, no preenchimento de defeitos causados por osteomielite crônica e observaram que a reabsorção do cimento ocorreu em média em 14 semanas e permitiu a formação de osso novo, sem maiores complicações.

Cimentos de sulfato de cálcio puro e na combinados com BMP bovina foram utilizados em vertebroplastia em coelhos osteoporóticos. Após 6 semanas de pós-operatório, promoveram o aumento da resistência à compressão das vértebras e as medidas do conteúdo mineral ósseo (*Bone Mineral Content*, BMC) e da densidade mineral óssea (*Bone Mineral Density*, BMD) foram maiores em relação ao grupo controle. Além disso, o cimento com BMP promoveu um maior crescimento ósseo, devido ao efeito osteoindutivo da BMP, com melhor formação óssea tridimensional do osso trabecular (ZHANG, J. et al., 2014), mostrando que a combinação do cimento com moléculas bioativas ósseas é interessante para melhorar as propriedades do materiais.

2.3. Cimentos de Fosfato de Cálcio

As cerâmicas de fosfato de cálcio são materiais que possuem razão molar Ca/P variando de 0,5 a 2,0 e são encontrados em diferentes tipos (DRIESSENS et al. 1993).

Tabela 1. Fosfatos de cálcio, fórmula química e razão molar Ca/P.

Abreviação	Nome	Fórmula	Ca/P
MCPM	Diidrogenofosfato de cálcio monoidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
DCPD	Hidrogenofosfato de cálcio diidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
DCPA	Fosfato dicálcico (monetita)	CaHPO_4	1,0
OCP	Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
α e β -TCP	Fosfato tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,48
CDHA	Hidroxiapatita deficiente em cálcio	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	1,5
HA	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
TTCP	Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0

Fonte: LeGeros (1991).

Os fosfatos de cálcio podem se apresentar como biocompatíveis e osteocondutores, promovendo a resposta extracelular na interface, o que favorece o desenvolvimento de células ósseas. Por exemplo, HA pode ser utilizada como

material primário em reconstruções de defeitos ósseos que envolvem crânio e face, cirurgias orais, implantes dentoalveolares e na ortopedia (SEPULVEDA et al., 2002; KVETON, COELHO, 2004). HA granular e fosfato tricálcico (TCP) mostraram serem biocompatíveis em implantes de alvéolos dentais (ROSA et al., 1995). No entanto, eles diferem consideravelmente na velocidade de reabsorção. HA, por exemplo, é reabsorvida muito lentamente, em comparação com β -TCP e vidro bioativo. Rojbaní e colaboradores (2011) avaliaram a osteocondutividade dos fosfatos de cálcio em defeitos críticos de calotas de ratos e observaram que os TCP foram melhores osteocondutores que a HA, o que poderia ser atribuído à sua biodegradabilidade.

Segundo Le Guehennec e colaboradores (2005) e Misch (2006), quanto maior a razão molar Ca/P, menor a solubilidade do material, mas essa taxa também sofre influências quanto à composição química, pH local, tamanho, porosidade das partículas e cristalinidade.

Os cimentos de fosfato de cálcio (*Calcium Phosphate Cement, CPC*) são cimentos hidráulicos e podem ser preparados misturando-se um sal de fosfato de cálcio com água ou uma solução aquosa, onde o resultado dessa reação é uma pasta que pode reagir à temperatura ambiente ou corporal dando lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfato de cálcio formados durante a cura pelo intercruzamento dos cristais precipitados (GINEBRA et al., 2012).

Os CPC foram desenvolvidos por LeGeros, Chohayeb e Shulman (1982) e Brown e Chow (1983) no início de 1980, os quais demonstram a formação de HA na forma monolítica a temperatura ambiente ou corporal através de uma reação de hidratação. A formulação original consiste de uma mistura equimolar de fosfato tetracálcico e fosfato dicálcico (anidro ou hidratado) adicionada à água destilada, desta maneira, formando uma pasta. Desde então, vários estudos comprovaram que os cimentos de fosfato de cálcio são materiais biocompatíveis, osteocondutores, biodegradáveis e possuem grande capacidade de moldabilidade (TAKAGI; CHOW; ISHIKAWA, 1998; VAN DEN VREKEN et al., 2012).

Os primeiros CPC comerciais foram introduzidos na década de 1990 para o tratamento de defeitos maxilofaciais (FRIEDMAN et al., 1998), bem como para o tratamento de fraturas (CONSTANTZ et al., 1995). Desde então, novas formulações de cimento têm sido desenvolvidas para outras aplicações, como o preenchimento ósseo (WELCH; ZHANG; BRONSON, 2003; ARAL et al., 2008), reforço de ossos

com osteoporose (LIBICHER et al., 2006), fixação dos implantes metálicos (OOMS et al., 2003), fraturas de coluna vertebral e vertebroplastia (TAKEMASA et al., 2007).

Além dos CPC serem bioativos, promovendo uma ligação estável entre o defeito e implante, após serem implantados podem ser reabsorvidos, sendo progressivamente substituídos por um novo osso. A substituição surge com a reabsorção da superfície do cimento, em paralelo com o crescimento do osso, evitando assim espaços entre o implante e o tecido, e formação de osso guiado (osteocondução) (DRIESSENS et al., 1998).

A reabsorção pode ocorrer através de dois mecanismos diferentes: reabsorção ativa, regulada por células como macrófagos ou osteoclastos; e/ou reabsorção passiva, através da dissolução química ou hidrólise nos fluídos do corpo. Uma vez que a bruxita (hidrogenofosfato de cálcio diidratado, DCPD) é solúvel em fluídos corporais, cimentos de DCPD são reabsorvidos principalmente pelo mecanismo passivo (GROVER et al., 2003), enquanto hidroxiapatita, menos solúvel, é reabsorvida por mecanismo ativo (WENISH et al., 2003).

Outros fatores que interferem na reabsorção dos cimentos são: a incorporação das substituições iônicas, como a incorporação de carbonatos, porosidade e cristalinidade, além de fatores externos como a idade do paciente, sexo, metabolismo, saúde, hábitos sociais, local da implantação, fornecimento de sangue ou cargas mecânicas (HUGHES et al., 2015).

Os CPC endurecem devido a um processo de dissolução e precipitação. Embora, vários cimentos ósseos a base de fosfato de cálcio tenha sido desenvolvidos, dependendo de fatores como pH de cura e estabilidade termodinâmica, o produto final da reação de cura pode gerar DCPD ou HA (ALGE et al., 2012), embora alguns dos materiais de partida que não reagiram podem estar presentes (ZERBO et al., 2001). Se o cimento tem um valor de pH maior que 4,2, HA ou mais provavelmente hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) é favorecido; se o cimento apresenta um pH menor que 4,2, bruxita é favorecida, que sob certas condições podem desidratar e formar fosfato de cálcio anidro (monetita, DCPA) (ISHIKAWA et al., 1999).

A HA é um fosfato de cálcio hidratado, constituinte mineral natural, representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes (COSTA et al., 2009).

Devido à similaridade química da HA com o tecido ósseo, é o fosfato de cálcio mais estudado. Além do mais, é um dos materiais que apresenta melhor biocompatibilidade, estabelecendo ligações de natureza química com o tecido hospedeiro, permitindo a adsorção de moléculas bioativas e, desta maneira, favorecendo o crescimento ósseo. Todas as suas formas têm excelente biocompatibilidade e promovem a osteocondução e osteointegração (BRUIJIN et al., 1995). Implantes metálicos recobertos com HA demonstraram maior integração, isto é, rápida ligação ao osso interfacial (WHEELER, 1996; KOBAYASHI, N. et al., 2007).

Os cimentos que resultam na formação de HA ou CDHA podem ser classificados em duas categorias principais: cimentos monocomponentes, em que um único composto de fosfato de cálcio, no caso alfa fosfato tricálcico (α -TCP), hidrolisa originando o CDHA sem variar a relação Ca/P (GINEBRA et al., 1999); cimentos multicomponentes, em que dois ou mais fosfatos de cálcio, um mais ácido e outro básico, tomam forma depois de uma reação ácido-base. O componente básico é normalmente fosfato tetracálcico (TTCP) e os reagentes ácidos são DCPA ou DCPD (BROW; CHOW, 1983).

Embora cimentos de HA sejam muito estudados por se apresentarem próximos da composição inorgânica do osso, cimentos DCPD são mais solúveis sob condições fisiológicas e podem ser reabsorvidos após a implantação (XIA et al., 2006), pois promovem a liberação de íons cálcio e fósforo junto à interface implante/tecido, assim favorecendo a reabsorção, osteocondução e a mineralização, já que este é um dos precursores da HA.

O DCPD é metastável sob condições fisiológicas e por esta razão cimentos de DCPD reabsorvem muito mais rapidamente do que os cimentos de HA (APELT et al., 2004; CARRODEGUAS et al., 1999), porém a velocidade de reabsorção é imprevisível, podendo ocorrer reabsorção quase completa ou conversão em HA in vivo (BOHNER et al., 2003; GROVER et al., 2013). Se DCPD for convertido em DCPA, por aquecimento ou ajuste estequiométrico, a conversão em HA ocorre mais lentamente.

Todos os cimentos DCPD são obtidos como resultado de uma reação ácido-base, a maioria deles contendo β -TCP e um componente ácido, normalmente o diidrogenofosfato de cálcio monohidratado (MCPM) ou ácido fosfórico (BOHNER; MERKLE; LEMAITRE, 2000).

Dentro do grupo dos cimentos DCPD o tipo formado pela combinação do β -TCP e MCPM (MIRTCHI; LEMAITRE; TERAQ, 1989) apresenta uma cura relativamente rápida quando misturado à água (cerca de 30 segundos), porém com a adição de aditivos pode-se aumentar esse valor, assim como a resistência mecânica do cimento (HAN et al., 2009). Sabe-se que a quantidade que se forma de DCPD é proporcional à quantidade de MCPM incorporado à mistura. Neste caso, o processo de cura consiste na dissolução do MCPM seguida de uma progressiva cristalização de DCPD em toda a pasta (CARRODEGUAS, 2000). Vários aditivos têm sido utilizados para retardar o tempo de cura ou melhorar a moldabilidade dos cimentos desse sistema, como o sulfato de cálcio hemi e diidratado, pirofosfato de cálcio e, também, os polietilenoglicóis (PEG) e glicerol (ABERG et al., 2011).

Nos últimos anos, muitos estudos se dedicaram na combinação do potencial de reparação óssea dos CPC com a capacidade em incorporar fármacos ou outras moléculas com relevância terapêutica. Ao contrário de cimentos acrílicos, utilizados em cirurgias ortopédicas, a reação de cura dos CPC não é exotérmica, portanto permite a incorporação de diferentes moléculas bioativas (GINEBRA; TRAYKOVA; PLANELL, 2006a).

Stallmann e seus colaboradores (2006) compararam seis cimentos comerciais preparados com uma solução de gentamicina como componente líquido. Todos eles apresentaram um efeito *burst* nas primeiras 24 horas, o que poderia ser suficiente para uma terapia profilática. Os CPC apresentam perfis de liberação mais uniformes, alguns liberando até 17 dias, quando comparados com grânulos de fosfato de cálcio impregnados em solução de gentamicina.

Estudos comparativos entre CPC e PMMA mostraram que a liberação de gentamicina e amicacina foi maior nos CPC durante, pelo menos, 30 dias (ETHELL et al., 2000). CPC contendo vancomicina mantiveram a concentração desse fármaco mais elevada e por períodos mais longos do que os cimentos de PMMA (URABE et al., 2009).

Outras moléculas podem ser carregadas pelos cimentos, como fatores de crescimento, proteínas, peptídeo bioativos e antimicrobianos (SEEHHERMAN et al., 2006; KEMPEN et al., 2010). Para estudar o perfil de liberação de um peptídeo antimicrobiano (hLF1-11), foram utilizados CPC comerciais. Diferentes perfis de liberação foram obtidos por esses cimentos, onde a maioria dos cimentos

apresentaram efeito *burst* seguido de liberação contínua mais lenta e a concentração liberada nas primeiras 24 horas manteve-se íntegra e ativa contra *Staphylococcus aureus* (STALLMANN et al., 2003). Perez e colaboradores (2013) avaliaram a liberação de fator de crescimento fibroblástico (FGF) a partir de CPC e observaram que a granulometria dos pós-precursos interfere no perfil de liberação. Os resultados obtidos mostraram que quanto maior a granulometria, maior é a porcentagem de FGF liberada.

Desta forma, os CPC podem controlar a concentração e a cinética das moléculas liberadas, proporcionando ao mesmo tempo, um suporte osteocondutor na qual as células podem migrar e formar novo tecido ósseo.

2.4. Cimentos de Aluminato de Cálcio

Os cimentos de aluminato de cálcio (*Calcium Aluminate Cement, CAC*) e sua produção industrial foram patenteados pela Lafarge em 1908 (Société J&A Pavin de Lafarge, FR 391454) e a primeira produção industrial deste cimento foi em 1913 (Parr; Wohrmeyer, 2006).

O uso de CAC no campo odontológico iniciou-se no final dos anos 90, com o desenvolvimento de um material restaurador odontológico para uso no lugar do amálgama (DOXA AKTIEBOLAG, US 6620232B1), desenvolvido pela empresa sueca Doxa Certex AB, dando origem ao Doxadent®.

Um cimento endodôntico a base de aluminato de cálcio que tem sido muito estudado é o MTA. Este material é composto por cimento Portland (75%), Bi_2O_3 (20%) e $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5%) e foi desenvolvido como material para preenchimento retrógrado, tratamento de raiz e lesão de furca (TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999; MAIN et al., 2004), mas devido ao seu bom desempenho clínico e biocompatibilidade (KOH et al., 1998; MITCHELL et al., 1999) tem sido utilizado em várias outras situações, entre eles capeamento pulpar (ANDELIN et al., 2003) e pulpotomia. No entanto, alterações na sua composição têm sido propostas visando superar as suas características físico-químicas negativas (ASGARY et al. 2008), como difícil manipulação e alta taxa de dissolução levando a perda do material, principalmente no caso de retrobturação (BER et al. 2007), alta porosidade e tempo de cura (LUZ;

BORBA; PANDOLFELLI, 2014), escurecimento de dentes e gengivas (JACOBOVITZ; LIMA, 2008).

Diante destas características, um novo CAC endodôntico, EndoBinder, foi desenvolvido pela Universidade Federal de São Carlos (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2007, PI0704502-6), com a finalidade de preservar as propriedades positivas do MTA e suas aplicações clínicas, aumentar as possibilidades de uso e sem as suas desvantagens. Sabe-se que este material apresenta propriedades físicas e mecânicas adequadas e boa resposta celular, permitindo um maior desenvolvimento das células em estado avançado de diferenciação dos osteoblastos e uma menor reação tecidual em testes subcutâneos quando comparado com o MTA (CASTRO-RAUCCI et al., 2011; AGUILAR; GARCIA; PIRES-DE-SOUZA, 2012).

Atualmente o aluminato de cálcio também tem sido estudado como um cimento reparador em várias aplicações ortopédicas (ROEMHILDT; WAGNER; MCGEE, 2006; ENGQVIST et al., 2008; BURGUER et al., 2013). Morejón-Alonso, Carrodegas e Santos (2012) estudaram novas composições de cimentos para uso na ortopedia, adicionando aluminato de cálcio no tradicional cimento de α -TCP e observaram que a presença da fase cristalina CA ($\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$) compromete a precipitação de CDHA e aumenta a taxa de degradação dos cimentos, porém não apresenta comportamento citotóxico, confirmado pelos ensaios *in vitro*. Em relação a sua atuação clínica, foi observado que o CAC é biocompatível e bioativo, porém não atua como osteoindutor ou osteocondutor (BURGUER et al., 2013), como as vitrocerâmicas.

Dentre as principais fases cristalinas do CAC, pode-se destacar a fase CA, que hidrata-se mais lentamente, sendo responsável pelo processo de configuração hidráulica (PARKER; SHARP, 1982). Também pode ser observado a fase CA_2 ($\text{CaO} \cdot 2\text{Al}_2\text{O}_3$), que pode acelerar o processo de cura da fase CA; a fase C_3A ($3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$) que é a mais reativa entre essas fases, mas está presente em quantidades muito pequenas ou não é observada em cimentos de aluminato de cálcio; e a fase C_{12}A_7 ($12\text{CaO} \cdot 7\text{Al}_2\text{O}_3$) que se hidrata rapidamente, podendo ser utilizada quando se quer controlar o tempo de cura. A dissolução dessas fases em contato com a água promove a liberação de íons Ca^{2+} , $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ e OH^- , o que

promove a saturação da solução, seguido da precipitação de hidratos de aluminato de cálcio e hidróxido de alumínio (ALT; WONG; PARR, 2003).

Dependendo da aplicação do material, pode-se produzir CAC de alta pureza com diferentes proporções das fases cristalinas. Andrade e colaboradores (2014) visando determinar uma mistura mais adequada entre as fases de aluminato de cálcio (CA, CA₂, C₃A e C₁₂A₇) para atender as necessidades do cimento para aplicações na área da saúde, observaram que a produção de fases puras de aluminato de cálcio é possível quando se emprega a rota Al₂O₃-CaO, sem a presença de CaO livre que reduziria o tempo de cura e aumentaria a temperatura de hidratação.

O interesse do CAC em uso clínico se deve, dentre outras, a sua coloração branca, baixa temperatura durante a cura e o controle do tempo de reação pela adição de aditivos específicos. Outro ponto é que o CAC tem boa resistência à corrosão em contato com fluídos do corpo, são biocompatíveis e a quantidade de íons Al liberados é muito baixa (MOREJÓN-ALONSO; SANTOS; CARRODEGUAS, 2009).

Um dos cimentos de aluminato de cálcio comercial que também tem sido estudado é o denominado Secar[®] 71, um cimento puro que permite a formulação de todos os tipos de concretos refratários e possui aproximadamente 70% de alumina (KERNEOS ALUMINATES TECHNOLOGIES, 2006, Tabela 2). Pelo processo de sinterização ocorre a formação das fases CA e CA₂, com uma pequena quantidade de alumina remanescente (Tabela 3). Sua composição comercial não contém nenhum aditivo, sendo que sua alta compatibilidade com aditivos permite a otimização de diferentes formulações. Sua composição química é particularmente adaptada para determinadas condições onde a pureza é essencial, como em ambiente redutores de hidrogênio ou monóxido de carbono, e possui excelentes propriedades mecânicas. Oliveira, Pandolfelli, Jacobovitz (2010) estudaram a influência de aditivos sobre propriedades físico-químicas do cimento de aluminato de cálcio, Secar[®] 71, e Grey-MTA e observaram que a presença de aditivos no CAC promoveu melhores características, como resistência mecânica e baixa porosidade, quando comparado com o MTA.

Tabela 2. Componentes principais do cimento Secar 71.

	Valores habituais (%)
Al_2O_3	68.7 - 70.5
CaO	28.5 - 30.5
SiO_2	0.2 - 0.6
Fe_2O_3	0.1 - 0.2
MgO	<0.5
TiO_2	<0.4
SO_3	<0.3
$\text{K}_2\text{O}+\text{Na}_2\text{O}$	<0.5

Fonte: Kerneos Aluminates Technologies (2006).

Tabela 3. Principais fases minerais do Secar 71. (C=CaO, A= Al_2O_3)

	Secar 71
CA	XXXXX
CA_2	XXX
A	X
C_{12}A_7	traços

Fonte: Kerneos Aluminates Technologies (2006).

Nos últimos anos, os estudos envolvendo cimentos biocerâmicos têm direcionado seus esforços no desenvolvimento de biomateriais multifuncionais, isto é, além de sua estabilidade química, promover ótimo contato entre osso e implante, uma melhor compatibilidade que a dos metais, ser bioativo, desempenhar um papel de carreador de fármacos e moléculas de interesse biológico para combater as infecções ósseas ou promover a reparação tecidual de forma mais eficiente ou até mais rápida.

Dentre as moléculas que podem ser carregadas pelos cimentos, peptídeos sintéticos surgem como uma alternativa interessante já que, além do amplo espectro de atividade e pela facilidade de reconhecimento e ligação aos sítios específicos das proteínas da matriz extracelular, podem ser utilizados em combinação com outros fármacos.

2.5. Peptídeo de Crescimento Osteogênico (*Osteogenic Growth Peptide*)

O processo de reparação óssea é um conjunto complexo de eventos biológicos regulados por células específicas, pela matriz extracelular e por diferentes fatores de crescimento.

Os fatores de crescimento e citocinas são importantes reguladores do processo de reparação e combinados às suas proteínas de ligação, agem como reguladores locais das funções celulares, estimulando a diferenciação, proliferação, migração, adesão celular e expressão gênica (WOZNEY; SEEHERMAN, 2004). Assim, a liberação de fatores de crescimento nos locais lesionados pode complementar a terapia convencional de reparação óssea.

Várias moléculas têm sido usadas para melhorar os resultados clínicos em cirurgias ortopédicas, como exemplo as BMP, que são capazes de estimular a reparação de fratura por serem osteoindutivas.

O conceito de osteoindução foi primeiro descrito por Urist (1965) quando observou a neoformação óssea no interior de matrizes ósseas desmineralizadas. Desde então, estas proteínas têm sido descritas como fatores responsáveis pela neoformação óssea (EPPLEY; PIETRZAK; BLANTON, 2005), pois as BMPs atraem células mesenquimais para o local da formação óssea e induz a conversão destas células em uma linhagem pré-osteoblástica. No entanto, há um certo questionamento sobre a relação custo-eficácia das BMPs, devido à grande quantidade necessária ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, dose terapêutica do INFUSE® Bone Graft) para se obter uma reparação óssea eficaz em comparação às técnicas cirúrgicas convencionais (EPSTEIN, 2011) que pode limitar seu uso em relação aos demais materiais.

Estratégias que envolvem o uso de moléculas pequenas, tais como peptídeos, podem ser vantajosas em comparação às biomoléculas mais complexas, conduzindo a formulações de biomateriais com custo mais baixo e de composições variáveis. Os peptídeos são biomoléculas constituídas por dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas (MACHADO et al., 2004), e têm demonstrado interesse científico quando o assunto é moléculas osteoindutoras ou modeladoras de fatores de crescimento.

Várias sequências peptídicas têm sido sintetizadas diretamente pela Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS), incluindo *motifs* indutores da medula óssea. Dentre os peptídeos de interesse na engenharia óssea, destaca-se uma sequência peptídica reguladora de fatores de crescimento ósseo, conhecida como *Osteogenic Growth Peptide* (OGP).

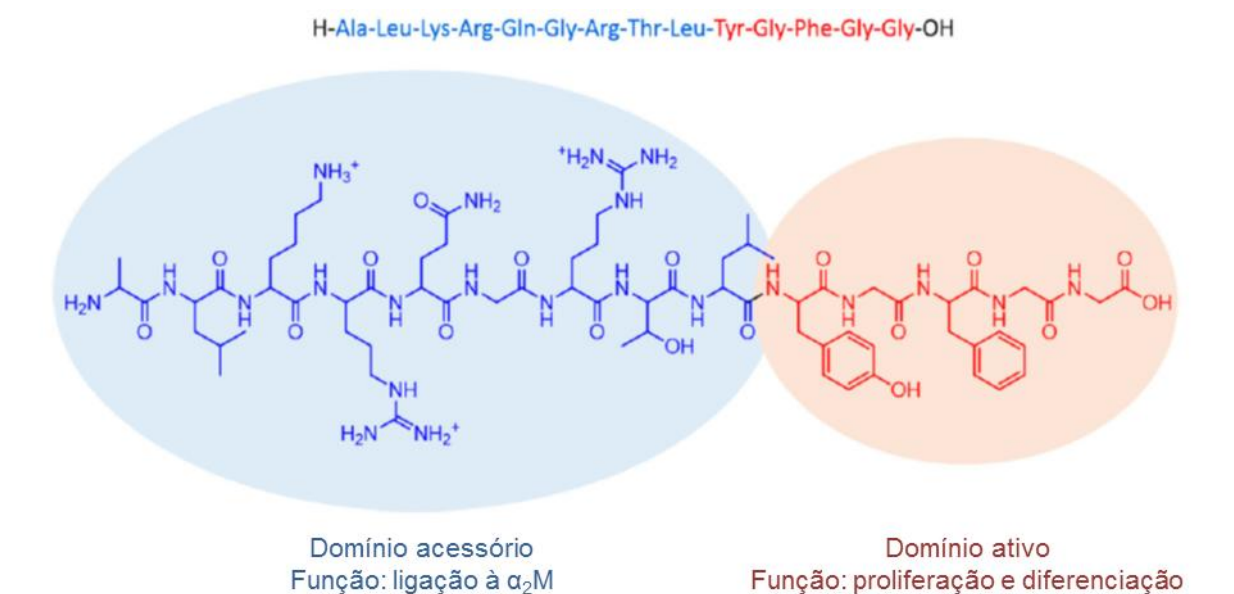
O OGP é um peptídeo de ocorrência natural cuja estrutura primária é idêntica a sequência C-terminal 89-102 (Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly) da Histona H4. É um tetradecapeptídeo endógeno presente fisiologicamente no soro humano, em concentração micromolar (BAB et al., 1992). Seu pequeno tamanho e linearidade, que o faz susceptível a proteólise, aliada à baixa concentração, sugere uma proteína de ligação para o OGP, OGPBP-OGP (OGPBP: OGP *binding protein*), que promove sua proteção contra proteólise e a manutenção da concentração deste peptídeo na circulação (BAB; CHOREV, 2002).

A maioria do OGP sérico encontra-se ligado não covalentemente a α_2 -macroglobulina (α_2 -M) do soro, em ambas as formas, nativa e ativada. A forma ativada gera ligações covalentes com as proteinases, em um processo que envolve uma mudança conformacional, tornando a molécula mais compacta, diminuindo, dessa forma, a disponibilidade do OGP para o sistema. A forma nativa aumenta imediatamente a disponibilidade do OGP para o sistema circulatório (GAVISH et al., 1997), onde sua concentração é aumentada durante uma injúria local ao tecido ósseo, medula óssea ou a reações osteogênicas sistêmicas (BAB et al., 1992). Estudos indicaram que o OGP se liga as OGPBPs por vias diferentes daquelas que são reconhecidas pelos anticorpos anti-OGP (Figura 2) (GREENBERG et al., 1995).

A sequência fisiologicamente ativa do OGP, a qual corresponde ao pentapeptídeo C-terminal OGP 10-14, é gerada por clivagem proteolítica (BAB et al., 1999). Este fragmento interage diretamente com os receptores da membrana celular e atua na ativação das vias de sinalização de *MAP cinase*, *Src* e *RhoA* (GABARIN et al., 2001; MIGUEL et al., 2005; MATTII et al., 2008).

Assim, no soro sanguíneo o OGP existe como: (1) sequência completa ligada a uma proteína de ligação, (2) sequência completa livre, e (3) sequência proteoliticamente clivada em OGP[10-14] (POLICASTRO; BECKER, 2015). Cada forma de OGP desempenha um papel importante na regulação, proteção e atividade desta molécula.

Figura 2. Domínios funcionais no peptídeo OGP. A porção N-terminal compreende o domínio que participa da ligação às OGPBP (α_2M) para regulação da concentração no soro e proteção contra clivagem proteolítica. A porção C-terminal participa do reconhecimento e ligação ao receptor macromolecular, sinalização da via mitogênica e diferenciação dos osteoblastos.



Fonte: Adaptado de POLICASTRO; BECKER, 2015.

Os primeiros estudos pós-descoberta do OGP, revelaram a sua capacidade em promover a proliferação e diferenciação de linhagens celulares osteoblásticas (BAB et al., 1988), onde após a ablação da medula óssea, a concentração circulante de OGP aumenta, o que sugere a sua participação no processo de reparo do tecido ósseo (BAB et al., 1985; FOLDES et al., 1989; BAB et al., 1992). A partir de então, essa molécula tem sido estudada tanto como um fator de crescimento solúvel em meio de cultura, quanto funcionalizados em materiais, para aumentar a diferenciação dos osteoblastos *in vitro* e *in vivo*.

In vitro, o OGP e seus derivados possuem excelente potencial mitogênico em células de linhagem osteoblástica e fibroblástica (BAB et al., 1992; GREENBERG et al., 1993), favorecem o aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e da mineralização da matriz óssea (ROBINSON; BAB; NEVO, 1995; BAB; CHOREV, 2002; SASKA et al., 2012) e ainda regulam diretamente a diferenciação de células mesenquimais de medula em osteoblastos (CHEN, Z. X. et al., 2007; VANELLA et al., 2010), assim como sua proliferação (MAIA et al., 2014), favorecendo a neoformação óssea. Ambas sequências, OGP e OGP[10-14], aumentaram a proliferação de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 nos períodos iniciais de

observação, quando imobilizadas na superfície de um substrato polimérico (MOORE et al., 2010) e óxidos metálicos (TANG et al., 2014; CHEN, C. et al., 2015). Em culturas de células mesenquimais de medula de rato (rMSC), o OGP funcionalizado na superfície de discos a base de hidroxiapatita promoveu a expressão de marcadores osteogênicos específicos, como *Runx-2*, osteocalcina e osteopontina, sugerindo um papel importante na diferenciação das rMSC em osteoblastos (POLINI et al., 2014).

In vivo, o OGP regula a expressão dos fatores de crescimento de transformação TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, fator de crescimento fibroblástico FGF-2, fator de crescimento insulínico IGF-1 e do colágeno tipo I (BRAGER et al., 2000), favorece a reparação da medula óssea recém transplantada ou irradiada, com aumento considerável das células hematopoiéticas (GUREVITCH et al., 1996). Estudos com administração via sistêmica do OGP relata o estímulo da ossificação endocondral em locais de fratura tanto em ratos quanto em coelhos, reduzindo o tempo de reparação óssea (SUN; ASHHURST, 1998; BRAGER et al., 2000; GABET et al., 2004). Defeitos em ossos longos de coelhos tratados com *scaffolds* de ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) com o peptídeo OGP sintético adsorvido foram reparados em um menor tempo em relação aos animais que receberam o OGP por via sistêmica; este estudo apontou um importante resultado na via de administração destes peptídeos, revelando um efeito terapêutico mais eficaz quando aplicado localmente (SHUQIANG et al., 2008).

A presença de peptídeo OGP em membranas de celulose bacteriana com hidroxiapatita, utilizadas em defeitos críticos em calvária de camundongos, promoveu a expressão dos genes *Runx-2*, *Tnfrs11b* e *Bglap*, relacionados à proliferação, diferenciação e mineralização dos osteoblastos, nos períodos iniciais pós-operatório (PIGOSSI et al., 2015). Em teste subcutâneo, análogos do peptídeo OGP, incorporados em membranas de alginato, promoveram a diferenciação osteogênica de células mesenquimais de medula humana (hMSC) (MAIA et al., 2014).

Os estudos têm sido direcionados na imobilização desse peptídeo nos biomateriais, ou seja, no desenvolvimento de materiais que podem ser utilizados como carreadores dessa molécula, pois permitem a retenção do peptídeo no local do defeito por períodos de tempo prolongados (POLICASTRO et al., 2015), mostrando

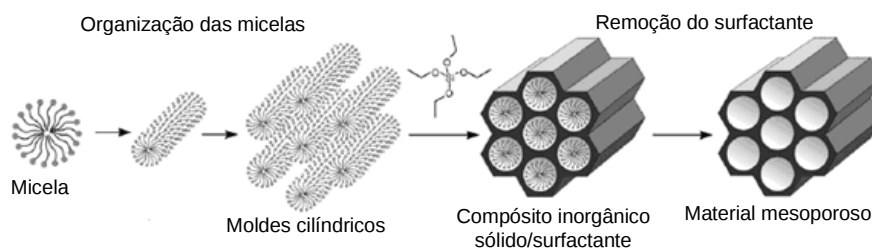
melhores resultados que a aplicação intravenosa. Entre eles, podem ser citados os materiais mesoporosos, que devido às suas características físico-químicas, como área de superfície específica alta, podem carrear um número grande de fármacos, proteínas e peptídeos.

2.6. Sílica Mesoporosa

Os materiais mesoporosos têm sido muito estudados devido ao interesse comercial de seus usos como adsorventes, em catálises e suporte para adsorção de biomoléculas (VINU; HOSSAIN; ARIGA, 2005).

De acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), os materiais porosos são classificados em três classes: microporosos (diâmetro do poro entre 0,2-2,0nm); mesoporosos (2,0-50,0nm); macroporosos (acima de 50,0nm) (SING et al., 1985). O tamanho dos mesoporosos permite não somente o fácil acesso de moléculas com tamanho acima de certa extensão, mas também o controle de funções dependendo da geometria do poro.

A síntese de materiais mesoporosos ordenados requer o emprego de moléculas de tensoativos em solução aquosa. Nessas condições, quando a concentração do surfactante em dissolução alcança um valor crítico, denominado concentração micelar crítica, as moléculas formam agregados denominados micelas, cuja forma e tamanho depende essencialmente da natureza e composição química da molécula de tensoativo, de sua concentração e da temperatura, junto com fatores como o pH da solução e a concentração total salina (Figura 3). As micelas, por sua vez, agrupam formando estruturas supramicelares, e a natureza das distintas fases micelares varia em função da concentração e temperatura (VALLET- REGI; VILLAREJO, 2006).

Figura 3. Mecanismo de formação da sílica mesoporosa.

Fonte: Adaptado de Hoffman, F. et al. (2006).

A estrutura dos materiais mesoporosos de sílica é formada por uma rede de tetraedros SiO_4 conectados entre si mediante os átomos de oxigênio dos vértices. Naturalmente, esta é uma característica compartilhada pelos silicatos cristalinos, como as zeolitas ou por sílicas amorfas. Os grupos Si-OH na superfície do material são capazes de reagir com uma grande variedade de compostos químicos formando ligações covalentes do tipo Si-O-R que permite fixar diferentes espécies químicas (VALLET- REGI; VILLAREJO, 2006).

Em 1998, foi desenvolvida uma rota de preparação de sílica mesoporosa ordenada a partir do emprego de moldes à base de tensoativo não-iônico ou de copolímeros polietoxilados e polipropoxilados como o Pluronic® P123 ($\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$) agentes direcionadores de estrutura (ZHAO, D. et al., 1998). A formação de sílica se dá à temperatura ambiente, a partir da adição do tetraetilortosilicato em solução fortemente ácida ($\text{pH} \pm 1,5$) contendo o tensoativo não-iônico ou o copolímero. Esse material foi desenvolvido na Universidade de Santa Bárbara, nos Estados Unidos, e denominado SBA-15 (*Santa Barbara Amorphous number 15*) (ZHAO, D. et al., 1998).

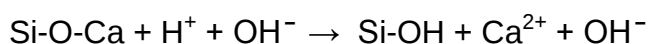
O SBA-15 possui uma rede hexagonal de mesoporosos e apresenta estreita distribuição de tamanho de poros, usualmente na faixa de 4,6 a 30nm, e áreas superficiais na faixa de 690 a 1040 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$. Devido à maior espessura das paredes de seus poros (3,1 a 6,4nm) ele apresenta uma melhor estabilidade hidrotérmica quando comparado com outras partículas de estrutura semelhante (CIESLA; SCHÜTH, 1999). Além disso, pode possuir mesoporos primários, mesoporos secundários e microporos não ordenados entre suas paredes (SOUSA et al., 2008).

Materiais mesoporosos de sílica obtidos por processo sol-gel têm demonstrado excelente bioatividade. Desde as fases iniciais de pesquisa de biomateriais, ficou claro que uma elevada área superficial desempenha um papel importante na bioatividade (HENCH et al., 1971), assim como uma superfície com carga negativa é relatada como fator importante na formação de hidroxiapatita (HA) (ANDERSSON et al., 2005; HENCH, 2006; SOUSA; SOUZA; SOUSA, 2008). Hench e Paschall (1973) avaliaram a influência da sílica na bioatividade do Bioglass® e concluíram que a alta densidade dos grupos silanóis (Si-OH) existentes na superfície da sílica amorfa é considerada responsável pelo crescimento da HA.

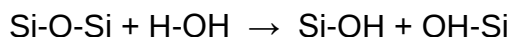
Um material é dito bioativo quando é capaz de formar apatita em sua superfície em contato com fluídos fisiológicos in vivo ou uma solução que simula a concentração iônica do plasma sanguíneo, conhecida como SBF (*Simulated Body Fluid*), in vitro (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). As espécies iônicas inorgânicas dissolvidas no plasma, como uma solução saturada em relação aos fosfatos de cálcio, apresentam um grande potencial de precipitação neste meio (ZHAO, L. et al., 2008). Nessa apatita formada, osteoblastos podem se aderir, crescer e se proliferar, o que significa que o material é bioativo e pode ser implantado (VALLET-REGÍ et al., 2006).

Existem dois principais protocolos in vitro para prever o comportamento dos materiais no interior do corpo humano. O teste mais simples é o protocolo estático, baseado na introdução do material teste em SBF; e o dinâmico, onde o SBF é continuamente trocado por meio de uma bomba peristáltica (VALLET-REGÍ et al., 2008). Os mecanismos de formação de apatita em SBF em materiais contendo grupos Si-OH em suas superfícies têm sido estudados em detalhe. Takadama e colaboradores (2001; 2002) descreveram cinco estágios de formação de HA em vidros bioativos, que estão resumidos a seguir:

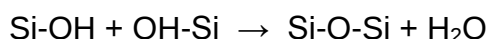
Estágio 1: rápida troca iônica entre íons Ca^{2+} pertencentes à superfície do material com íons H^+ da solução, ocasionando aumento do pH do meio e formação de grupos silanóis (Si-OH):



Estágio 2: liberação de sílica solúvel do material para a solução na forma $\text{Si}(\text{OH})_4$, sendo resultado da quebra de ligações siloxano (Si-O-Si) e contínua formação de grupos silanol:



Estágio 3: policondensação dos grupos silanol formando uma camada porosa rica em sílica na superfície do material:



Estágio 4: aumento da concentração de íons na solução com o passar do tempo, ocorrendo posterior formação de um filme amorfo, rico em Ca^{2+} e PO_4^{3-} na superfície do material, quando o ponto de saturação da solução é alcançado. A alta área superficial da camada rica em sílica age como uma fonte de sítios para a nucleação heterogênea do filme, que cresce pela incorporação de mais íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} presentes na solução;

Estágio 5: formação da apatita na superfície do material em consequência da cristalização do filme amorfo, rico em íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , pela incorporação dos ânions OH^- e CO_3^{2-} presentes na solução.

Outra importância tecnológica potencial inerente a esses materiais é a sua característica porosa, pois pode ser usada para confinar uma variedade de moléculas para muitos processos químicos e biológicos. Como a rede de sílica mesoporosa apresenta transparência óptica no visível, perto da região UV, os materiais com grupos funcionais opticamente ativos são candidatos promissores para aplicações ópticas incluindo filtros, sensores, lasers, fotocatalise, adsorventes (BECK; VARTULI, 1996). A obtenção de materiais incorporados com moléculas de corantes ou íons luminescentes (KOOLE et al., 2008; ROCHA, L. A., 2010; PARK et al., 2012) torna-se extremamente interessante para aplicações ópticas e fotônicas. As propriedades da superfície e os tamanhos das partículas podem permitir a atuação como sensores dentro de células tanto in vitro quanto in vivo (SLOWING et

al., 2007), além da atuação em terapia fotodinâmica (LEE, J. E. et al., 2011; ZHANG, Z. et al., 2012; COHEN; SHOUSHAN, 2013). A superfície modificada com estas moléculas permite o reconhecimento específico entre as espécies livres e as imobilizadas, podendo proporcionar informações diagnósticas.

Em função de sua capacidade de adsorção e biocompatibilidade, a sílica mesoporosa têm sido empregada no desenvolvimento de materiais para reparação do tecido ósseo, devido a sua natureza atóxica, ajustável diâmetro de poros e elevada área superficial (ZHAO, L. et al., 2008). Sua porosidade, aliada à área de superfície alta, permite que essas partículas sejam usadas como dispositivos para liberação de moléculas biologicamente ativas, como fármacos, proteínas e enzimas (BHARALI et al., 2005; KANG et al., 2009).

Estudos usando sílica mesoporosa como adsorvente da gentamicina, um antibiótico usualmente empregado na traumatologia, mostraram que após implante em fêmur de ratos este material promoveu integração óssea, crescimento de tecido cortical e esponjoso que permitiu que o defeito ósseo fosse restaurado. Além do mais, o nível de gentamicina local foi superior a concentração inibitória mínima, sendo sensível para a maioria dos microrganismos (ARCOS et al., 2002, WO 2002102430).

A incorporação de albumina bovina (BSA) em partículas de SBA-15 foi mostrada ser dependente do tamanho dos poros, onde o máximo de proteína incorporada foi 0,15g de BSA por grama de SBA-15. Já os ensaios de liberação mostraram um comportamento *burst*, onde aproximadamente 90% de BSA adsorvida foi liberado no período de 24 horas (SONG; HIDAJAT; KAWI, 2005). Utilizando amostras de SBA-15 como carreador do peptídeo osteostatina, que corresponde a sequência (107-111) da porção C-terminal da proteína relacionada ao hormônio paratireoidiano (PTHrP), foi demonstrado que houve aumento no crescimento celular e na expressão de vários produtos osteoblásticos, como fosfatase alcalina em cultura de células osteoblásticas (LOZANO, et al., 2010). A liberação de peptídeo OGP a partir de partículas de sílica do tipo SBA-15 mostrou que o perfil de liberação é dependente da concentração adsorvida (MENDES et al., 2013). Este fato também foi confirmado por Luo e seus colaboradores (2015) quando avaliaram o perfil de liberação de um peptídeo osteogênico (*Bone-Forming Peptide* - BFP) derivado da BMP-7 a partir de partículas de sílica mesoporosa.

As superfícies das partículas de sílica podem ser modificadas com moléculas orgânicas que possuem maior afinidade com fármacos e, consequentemente, aumentar o período de liberação. O hidrocloreto de enrofloxacino, uma quinolona de uso veterinário com ampla atividade antimicrobiana, foi incorporado às partículas de sílica mesoporosa funcionalizadas com diferentes concentrações de grupos aminos. Os resultados da liberação desse fármaco demonstraram ser dependente da concentração das moléculas funcionalizadoras, sendo que quanto menor, maior foi a liberação do fármaco (LIU et al., 2015); o mesmo foi observado com a liberação do fármaco aspirina, onde as partículas com superfície não modificada liberaram em uma velocidade maior (DATT; EL-MAAZAWI; LARSEN, 2012). Outro dado interessante é que essas partículas apresentaram toxicidade muito baixa após o cultivo com células de rim embrionárias humanas (*Human Embryonic Kidney*, HEK 293T) e células de feocromocitoma de rato (PC12) por 48 horas (LIU et al., 2015).

A possibilidade de combinar as propriedades de biocompatibilidade e liberação controlada de moléculas é um objetivo muito atrativo que pode ser compartilhado com junção dos cimentos biocerâmicos e de sílica mesoporosa, e devido basicamente às suas propriedades texturais extrínsecas, que pode induzir à bioatividade, juntamente com a opção de preencher os poros com agentes biológicos, tais como moléculas indutoras, como o peptídeo OGP.

3. OBJETIVOS

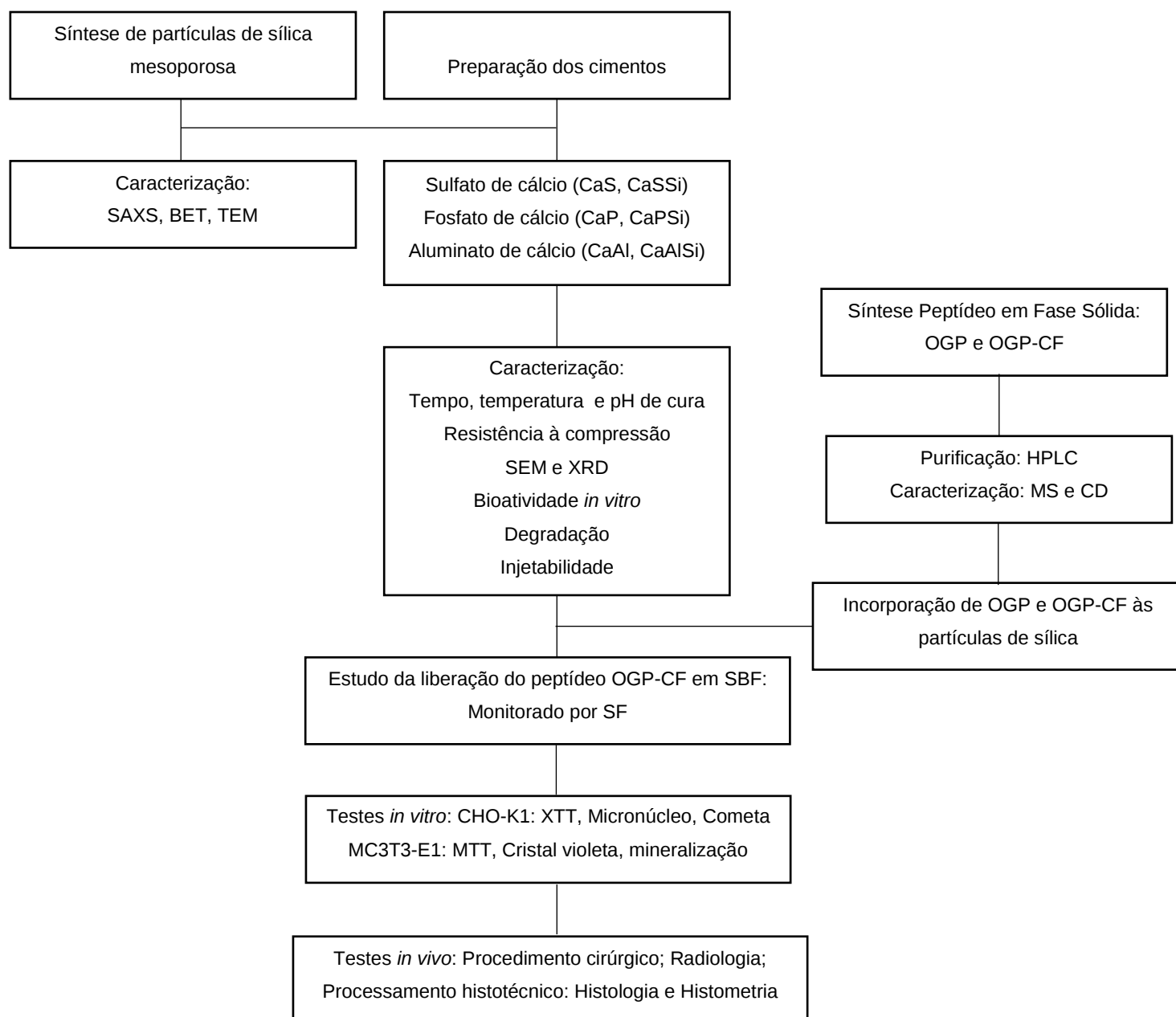
O objetivo deste trabalho foi desenvolver um cimento ósseo injetável, reabsorvível e bioativo, com sílica mesoporosa e peptídeo regulador de fatores de crescimento ósseo, para auxiliar a reparação óssea através da formação de uma camada estável de cálcio e fósforo em sua superfície, concomitante com sua degradação e liberação das moléculas desse peptídeo indutor. Para tanto, visou-se:

1. Sintetizar partículas de sílica mesoporosa, com arranjo hexagonal regular e alinhamento dos poros lineares e uniformes.
2. Preparar cimentos cerâmicos injetáveis, a partir de sulfato de cálcio, fosfato de cálcio e aluminato de cálcio, com ou sem sílica mesoporosa, assim como realizar as análises físico-químicas.
3. Sintetizar o peptídeo de crescimento osteogênico (*Osteogenic Growth Peptide*, OGP) pela Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.
4. Analisar a liberação controlada do peptídeo OGP marcado com 5,6-carboxifluoresceína por Espectroscopia de Fluorescência, após a confecção dos cimentos, bem como a liberação/interação com os íons da solução de SBF.
5. Realizar análises in vitro dos cimentos, através de culturas de células de ovário CHO-K1 e em culturas de células de pré-osteoblastos MC3T3-E1.
6. Realizar análises in vivo dos cimentos em defeitos ósseos de tamanho crítico em calvária de ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os cimentos foram estudados a partir de três sistemas cerâmicos: a) sulfato de cálcio; b) fosfato de cálcio e c) aluminato de cálcio, todos com adição de partículas de sílica mesoporosa e peptídeo OGP. A Figura 4 apresenta o fluxograma mostrando de forma resumida o desenvolvimento do trabalho.

Figura 4. Fluxograma representando resumidamente o trabalho desenvolvido.



Fonte: Elaborado pela autora

4.1. Síntese de partículas de sílica mesoporosa

As partículas de sílica mesoporosa foram preparadas a temperatura ambiente, a partir de soluções contendo bloco copolímero como agente direcionador de estrutura e tetraetilortossilicato $\text{Si}(\text{OEt})_4$ (TEOS) como fonte de sílica, no Instituto de Química de Araraquara, IQ-Unesp. Inicialmente foram dissolvidos 1,5g do copolímero não-iônico polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (Pluronic® P123, BASF) em 50 mL de água deionizada, ajustando o pH em 1,5 com solução de HCl $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$. Após dissolução completa do tensoativo em temperatura ambiente, o TEOS foi adicionado, sob agitação intensa. A etapa final da condensação foi produzida pela adição de solução de fluoreto de sódio (2,5mL, NaF $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$) e mantido em agitação por 24 horas. O produto obtido foi centrifugado por 10 minutos a aproximadamente 270 rcf, liofilizado e calcinado a uma temperatura de 600°C por 12h, para a completa eliminação do agente direcionador de estrutura.

4.1.1. Caracterização

Medidas de porosidade e de superfície específica (BET)

A área de superfície específica foi determinada pelo método de BET na razão de pressão relativa de 0,05-0,2 e a distribuição de tamanho de poros pela relação polinomial deduzida do modelo de Broekhoff e Boer (BdB) (PROUZET et al., 1999; BROEKHOFF; BOER, 1968). Os materiais obtidos foram caracterizados em um equipamento Micromeritics 2010 e 2020 no Instituto de Química de Araraquara/UNESP.

Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) das amostras foram realizadas na linha SAXS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS Campinas, Brasil), utilizando-se uma fenda assimétrica e monocromador de silício (111), com feixe monocromático ($\lambda = 1,488 \text{ \AA}$) e foco horizontal. A intensidade espalhada foi coletada com *imaging plate* localizado a 849,64 mm da amostra. A distância corresponde ao intervalo do vetor q de $0,018$ a $0,39 \text{ \AA}^{-1}$. Os *beam-stoppers*

horizontal e vertical foram usados para absorver o feixe de raios X direto e refletido, respectivamente. A maioria dos padrões exibe pico de difração simples os quais foram atribuídos à distância de correlação dos poros. A distância de correlação do centro de um poro ao outro centro de outro poro é chamada de *d-spacing*. O efeito da absorção foi corrigido para todas as amostras.

Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As medidas de TEM foram realizadas em um aparelho Philips CM20, com tensão de aceleração 200kV, do Instituto de Química de Araraquara/UNESP. A preparação da amostra foi realizada por suspensão em etanol, depositadas e secas em grades de Cu recobertas por carbono.

4.2. Preparação e caracterização dos cimentos

Testes de manipulação dos cimentos

O componente sólido dos cimentos foi preparado misturando sílica mesoporosa às cerâmicas, na porcentagem de 5% em massa, de acordo com a Tabela 4. Cada formulação, sem ou com sílica, foi preparada pela mistura do componente pó ao componente líquido, com ajuda de uma espátula, por 3 minutos.

Para a preparação das pastas, os cimentos cerâmicos em pó foram colocados em uma placa de vidro. O componente líquido foi adaptado para cada cimento com o intuito de se obter pastas moldáveis. Para tanto, água, PEG 400 ou dispersão aquosa de carboximetilcelulose (CMC), na concentração de 1% em massa, foram adicionados aos cimentos de sulfato de cálcio (CaS), de fosfato de cálcio (CaP) e de aluminato de cálcio (CaAl), respectivamente. A melhor razão líquido/pó (L/P) foi determinada, em mL.g⁻¹, sendo a mínima necessária para obter uma massa plástica manipulável.

Tabela 4. Composição dos cimentos, componente líquido, porcentagem de sílica e razão L/P.

Biocerâmica	Código	Sólido	Líquido	SiO (%m)	Razão L/P
Sulfato de Cálcio	CaS	CaSO ₄ -Hemi	Água Deion	-	0.33
Sulfato de Cálcio + Sílica	CaSSi		Água Deion	5%	0.40
Fosfato de Cálcio	CaP	βTCP-MCPM	PEG400/H ₂ O	-	0.33
Fosfato de Cálcio + Sílica	CaPSi		PEG400/H ₂ O	5%	0.40
Aluminato de Cálcio	CaAl	Secar 71	1%m CMC	-	0.33
Aluminato de Cálcio + Sílica	CaAlSi		1%m CMC	5%	0.40

Fonte: Elaborado pela autora

4.2.1. Caracterização

Tempo, temperatura e pH de cura

Os cimentos foram colocados em moldes cilíndricos e então mantidos em incubadora a 37°C com 100% de umidade e imersos em solução de SBF, pH 7,4, que possui concentração iônica semelhante à do plasma sanguíneo, preparado de acordo com Kokubo e Takadama (2006; ISO 23:317/2007), até alcançar o tempo final de cura. O tempo final de cura é o tempo em que a agulha (300g; $\Phi = 1\text{mm}$) não penetra mais que 0,5mm da amostra ou provoca somente marcas em sua superfície. Assim, o tempo de cura dos cimentos foi medido com o aparato de Vicat, baseado na *American Society for Testing and Materials C187-11* (ASTM, 2011 - *Standard Test Method for Normal Consistency of Hydraulic Cement*), no Instituto de Cerámica y Vidrio de Madrid. Para cada formulação, foram realizadas três repetições e as médias e os desvios foram calculados.

A temperatura do cimento registrada em função do tempo foi determinada com a ajuda de um aparato adaptado com um termopar, conectado a um sistema de registro de dados automático ESA 9800 (Matec Applied Sciences). O sensor foi inserido dentro da pasta e as medidas foram iniciadas, sendo a temperatura mantida por um banho termostático com circulação a 37°C.

A análise do pH induzido pelas formulações dos cimentos foi determinada pela imersão dos corpos de prova, logo após a manipulação e moldagem, em solução SBF, pH inicial 7,4, a 37°C, com razão área de superfície/volume $0,1\text{cm}^{-1}$,

em frascos de polietileno tampados. Foi utilizado um pHmetro digital HI 8521 Hanna Instruments e as medidas foram feitas a cada 10 minutos por 24 horas.

Difração de Raios X (XRD)

Os raios X são radiações eletromagnéticas que possuem elevadas energias e curtos comprimentos de onda. Quando um feixe de raios X incide sobre um material sólido, uma fração deste feixe se dispersa, ou se espalha, em todas as direções pelos elétrons associados a cada átomo ou íon que se encontra na trajetória do feixe. Assim, essa técnica é amplamente usada para identificação da composição cristalina dos materiais.

Após 24 horas em solução SBF, com umidade controlada, a 37°C, o cimento foi lavado com acetona, para parar o processo de hidratação, seco a 60°C e levado a um moinho de bolas Retsch por 2 minutos. Os difratogramas foram obtidos usando um Difrátômetro de Raios X Bruker modelo D8 Advance, com um filtro de níquel e sob radiação de Cu ($K\alpha$) a 40 kV e a 30 mA, com varredura angular entre 10° a 70° com passo de 0,02 s (2θ) e tempo de aquisição de contagem de 3 segundos para cada amostra, do Instituto de Cerámica y Vidrio de Madrid. As amostras foram fixadas sobre um suporte de vidro. A identificação das fases presentes nos materiais foi realizada comparando-se os dados obtidos com as fichas cristalográficas padrões da base de dados ICDD – PDF-2 (*International Centre for Diffraction Data – Power Diffraction File-2*).

Medidas de Resistência à Compressão

Para a determinação da resistência à compressão, as pastas de cada formulação foram transferidas para moldes cilíndricos. O molde foi confeccionado em Teflon contendo cavidades cilíndricas de 6mm de diâmetro e 12mm de altura, seguindo as orientações da norma ASTM F451 (2012 - *Standard specification for acrylic bone cement*). Antes do preenchimento com a pasta, as cavidades foram levemente lubrificadas com silicone para facilitar a remoção dos corpos de prova do molde.

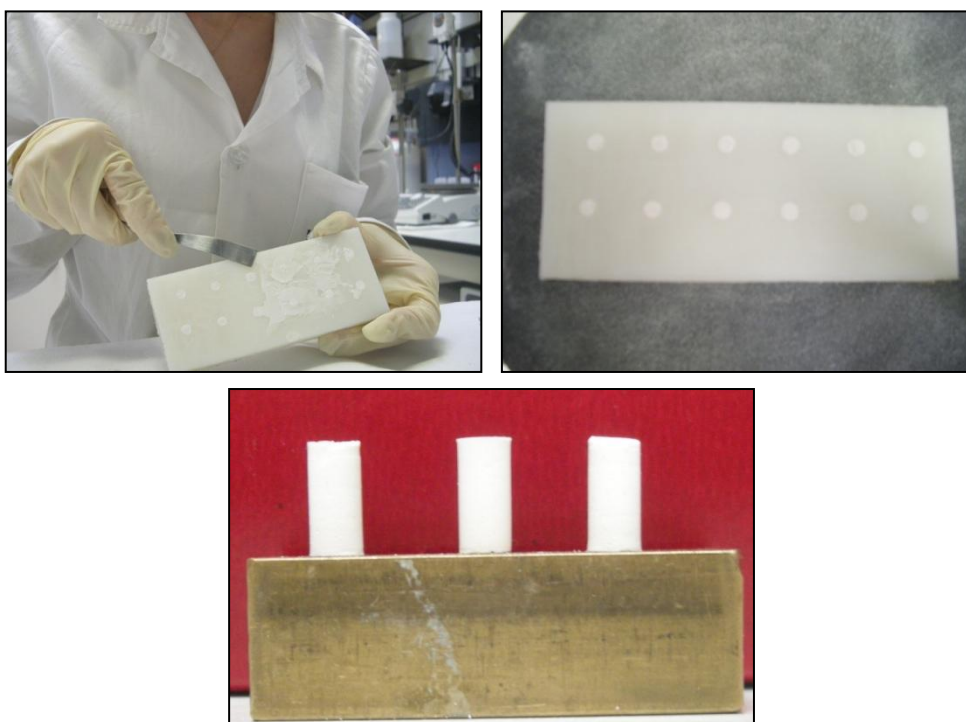
Os corpos de prova foram fabricados pela manipulação do cimento em placa de vidro e preenchimento do molde com ajuda de uma espátula de aço inoxidável. A correção do paralelismo das duas faces do molde foi feita através de um leve desgaste com a espátula metálica (Figura 5). Em seguida os corpos de prova foram desmoldados e aqueles que apresentavam defeitos visíveis, como bolhas e rupturas, foram descartados.

A resistência a compressão foi avaliada antes e depois de imersas por 24 horas e 7 dias em solução SBF. Para todas as formulações foram realizadas seis repetições usando uma máquina universal de ensaios Instron modelo 4443, do Instituto de Cerâmica y Vidrio de Madrid, com célula de carga 500N, a uma velocidade de $1\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$. A resistência à compressão foi calculada através da equação (1):

$$S = \frac{F_{max}}{A} \quad \text{eq.(1)}$$

em que F_{max} representa a carga máxima de ruptura na curva de carga-deformação e A é a área da secção transversal de cada espécime.

Figura 5. Conformação dos corpos-de-prova: preenchimento dos moldes, correção das faces e seleção para os testes de resistência à compressão daqueles que não apresentavam defeitos visíveis.



Fonte: Elaborado pela autora

Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica de caracterização muito usada para análise micro estrutural de materiais sólidos até a escala submicrométrica. A SEM pode ser usado para obter imagens da superfície dos materiais ou da superfície da fratura de materiais porosos, e ainda obter a composição química pela combinação com EDX.

As amostras provenientes dos ensaios de resistência mecânica foram mantidas na estufa a 60°C, onde após se tornarem secas, as fraturas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM). As medidas de SEM foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura Hitachi modelo S-4700 com resolução de 1,5nm a 15kV, com variação na voltagem de aceleração de 0,5 a 30kV, acoplado a uma microsonda para espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS) Noran e software System Six para as amostras do cimento CaS, e microscópio eletrônico de varredura Hitachi modelo TM-1000, com voltagem de aceleração a 16V, para as amostras dos cimentos CaP e CaAl, ambos pertencentes ao Instituto de Cerámica y Vidrio, Madrid. As amostras foram colocadas em um porta amostra e submetidas ao processo de metalização com prata, de aproximadamente 10 nm, para se promover uma superfície condutora.

Densidade e Porosidade Aparente

A densidade aparente e a porosidade aberta das amostras foram avaliadas pelo método de imersão, de acordo com a ASTM C20 (2010 - *Standard Test Methods for Apparent Porosity, Water Absorption, Apparent Specific Gravity, and Bulk Density of Burned Refractory Brick and Shapes by Boiling Water*). Este método se utiliza do Princípio de Arquimedes, baseado na medida do empuxo que sofre um corpo quando submerso em um líquido, de acordo com as equações 3 e 4:

$$\rho = \left(\frac{m_1}{m_3 - m_2} \right) \times \rho_{H_2O} \quad \text{eq.(2)}$$

$$P = \left(\frac{m_3 - m_1}{m_3 - m_2} \right) \times \rho_{H_2O} \quad \text{eq.(3)}$$

onde m_1 é o peso da amostra seca, m_2 é o peso da amostra submersa, m_3 é o peso da amostra úmida e ρ_{H_2O} é a densidade da água.

Foram utilizados seis corpos de prova conformados e água deionizada como líquido de flotação, onde para as medidas de massa imersa e úmida foi necessário que os corpos permanecessem imersos em água deionizada por um período de 4 horas. A massa seca foi determinada após a secagem destes por um período de 24 horas em estufa a 100°C.

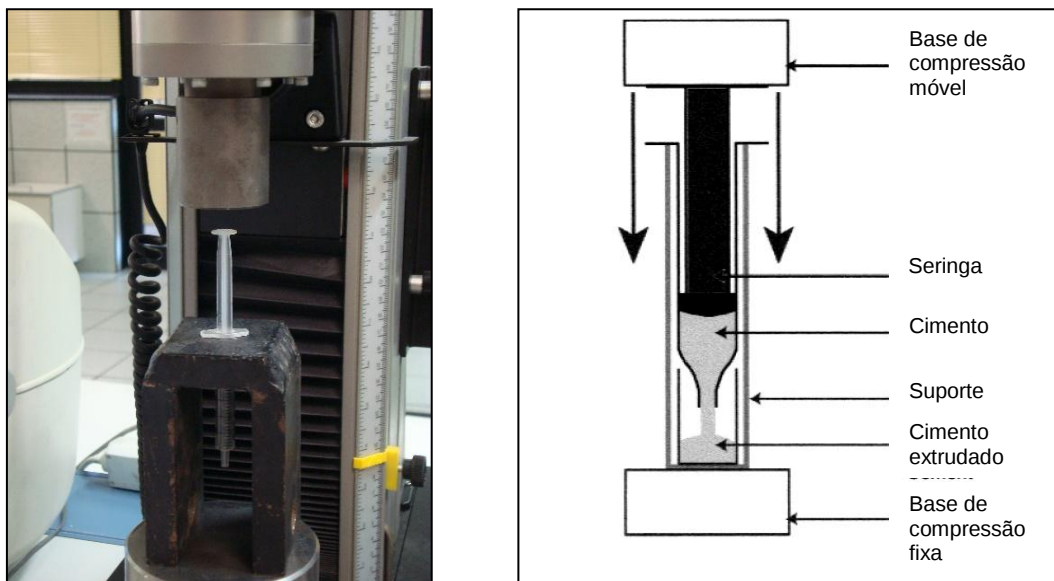
Injetabilidade

Esta metodologia foi baseada na quantificação das massas residuais de cimento retidas na seringa após a aplicação de uma força padrão, num período de tempo de injeção pré-estabelecido (4 a 30 minutos). Foram utilizadas seringas com capacidade de 5ml com abertura de saída de 2.0mm de diâmetro (BD Plastipak™). Dois gramas de cimento foram preparados e colocados dentro da seringa e mantidos em estufa a 37°C por períodos pré-determinados. Todas as seringas foram pesadas vazias e preenchidas com o cimento. As pastas foram extrudadas da seringa utilizando uma máquina de ensaios mecânicos universal ISTRON modelo 4443, com uma velocidade de compressão de 15mm.min⁻¹ e o processo de extrusão era finalizado quando se alcançava a força máxima de 100N (Figura 6).

Então, foi medido a massa das seringas após a extrusão e a injetabilidade foi calculada usando a Equação 4, onde I é a injetabilidade, m_i e m_f são a massa inicial e final da extrusão, respectivamente. Cada teste foi repetido por três vezes e os resultados apresentam a média dos valores obtidos.

$$I = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100\% \quad \text{eq.(4)}$$

Figura 6. Imagem e representação esquemática do aparato experimental utilizado para quantificar a injetabilidade dos cimentos.



Fonte: Elaborado pela autora e adaptado de Ginebra et al. (2001)

Bioatividade e Degradação in vitro em solução SBF

A bioatividade é definida como a capacidade de um material em provocar uma resposta biológica específica na interface do material que resulta na formação de uma adesão entre os tecidos e o material (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). Uma característica comum dos implantes bioativos é a formação de uma camada de hidroxiapatita (HA) na superfície. A HA é equivalente, em composição e estrutura, à fase mineral do osso. A interface entre o implante bioativo e o osso é próximo do que ocorre naturalmente entre ossos, tendões e ligamentos (HENCH; WILSON, 1993).

Kokubo e seus colaboradores (1990) desenvolveram uma solução que tem a composição química e pH próximo às concentrações do plasma, onde os testes in vitro podem ser realizados através da imersão das amostras nesta solução, conhecida como *Simulated Body Fluid* (SBF). Essa solução passou por algumas correções, e pelos resultados obtidos em dez institutos diferentes, a solução SBF corrigida (Tabela 5) foi proposta e aprovada em junho de 2007 pela Organização Internacional de Normalização (*International Organization for Standardization* – ISO)

como a solução indicada para se avaliar in vitro a capacidade de formação de HA na superfície de materiais destinados a implantes (norma ISO 23317: 2007).

Tabela 5. Concentração iônica do plasma sanguíneo humano e da solução SBF.

	Concentração iônica (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁺
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma Humano	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Fonte: Elaborado pela autora

A bioatividade das diferentes formulações de cimento foi avaliada através da imersão dos corpos de prova (15mm x 2,4mm), previamente imersos por 24 horas em solução de SBF a 37°C por um período de 7 e 14 dias, onde a razão área de superfície/volume foi 0,1cm⁻¹ (KOKUBO; TAKADAMA, 2006; ISO 23:317/2007) e a solução foi renovada todos os dias (YU et al., 2013). Após esses períodos, as amostras foram secas à temperatura ambiente e a superfície das amostras foi analisada por microscopia eletrônica de varredura, utilizando uma microscópio Hitachi modelo S-4700 com resolução de 1,5nm a 15kV, com variação na voltagem de aceleração de 0,5 a 30kV, acoplado a uma microsonda para espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS) Noran e software System Six, pertencente ao Instituto de Cerâmica y Vidrio, Madrid, para as amostras CaS e CaP. Para as amostras dos cimentos CaAl, foi utilizado um microscópio FEI Magellan 400 L com feixe de elétrons emitidos via FEG (*Field Emission Gun*), do Laboratório de Caracterização Estrutural – LCE/ DEMa/ UFSCar. As superfícies foram caracterizadas por EDS para análises qualitativas e semi-quantitativas simultâneas através de microanálise pontual por dispersão de energia de raios X com correção ZAF que considera a influência do número atômico (Z), a absorção do detector (A) e a fluorescência de raios X induzida na amostra (F).

A solução a ser substituída foi coletada e seu pH foi medido usando um pHmetro digital Hanna Instruments modelo HI 8521 e este processo foi repetido todos os dias.

Para avaliar a liberação-interação das amostras com os íons da solução, o volume substituído foi analisado via Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP), para avaliar as variações nas concentrações dos íons cálcio, fosfato e silício na solução. As análises foram realizadas em espectrômetro THERMO JARREL ASH modelo IRIS Advantage, com sistema de visualização dual, uma fonte de radiofrequência de 40, 68MHz, rede de difração tipo Echelle e detector de estado sólido de transferência de carga (CID).

Para a avaliação da degradação *in vitro*, as amostras secas foram pesadas e imersas em solução SBF a 37°C por até 28 dias, mantendo a mesma razão área de superfície/volume do ensaio anterior. A solução foi renovada todos os dias. Para cada período de tempo, as amostras foram removidas da imersão, lavadas com água deionizada e secas a 60°C por 24 horas e a degradação foi calculada pela equação 5, onde D é a taxa de degradação, M_i e M_f são as massas das amostras secas inicial e depois da imersão, respectivamente. Os valores representam a média de três testes realizados para cada amostra.

$$D = \frac{M_i - M_f}{M_f} \times 100\% \quad \text{eq.(5)}$$

4.3. Síntese do peptídeo OGP e OGP-CF em Fase Sólida

Para a obtenção da sequência peptídica estudada neste trabalho empregou-se um método de síntese química conhecido como Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS), devido ao fato de que o grupo α -carboxílico do aminoácido C-terminal encontra-se covalentemente ligado a um suporte polimérico ou resina (MERRIFIELD, 1984).

Empregou-se o protocolo de síntese Fmoc, que utiliza o grupamento base-lábil 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc) como protetor dos α -amino grupos, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção da maioria das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (FIELDS; NOBILE, 1999; CHAN; WHITE, 2000). Partiu-se de resina Fmoc-Gly-Wang (grau de substituição de 0,55 mmol.g⁻¹, Novabiochem) e como agentes de condensação foram utilizados diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidroxibenzotriazol (HOBt), que ativam o grupo carboxílico de um aminoácido, o qual sofre ataque nucleofílico do grupo α -amino de

outro aminoácido ou do aminoácido N-terminal de um fragmento peptídico ligado à resina, resultando deste modo na formação de uma ligação amida ou peptídica entre eles.

Na etapa de condensação de cada aminoácido, foi utilizado um excesso molar, em relação ao grau de substituição inicial de 3 equivalentes para cada Fmoc-aminoácido e 3 equivalentes para DIC e HOBt, em uma mistura de diclorometano (DCM) e dimetilformamida (DMF) na razão 1:1. Na desproteção dos grupos α -amínicos (remoção do grupo Fmoc), foi empregada uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF. A eficiência das etapas de condensação foi monitorada pelo teste de Kaiser (KAISER et al., 1970). Após os acoplamentos dos resíduos de aminoácidos, a massa total de peptidil-resina foi dividida em duas partes, onde uma delas foi utilizada para o acoplamento da carboxifluoresceína (CF).

A clivagem final do peptídeo e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada utilizando uma solução de clivagem (95% ácido trifluoracético, TFA, 2,5% triisopropilsilano, Tis, e 2,5% água deionizada), na razão 1mL:100 mg de peptidil-resina, a 25°C por 2 horas. O peptídeo bruto OGP foi precipitado e lavado com éter etílico gelado e centrifugado.

Após o procedimento de clivagem foi realizada a extração com ácido acético 10% em sistemas de seringas de polipropileno de 5 mL, equipadas com um filtro de polietileno poroso acopladas a um sistema de vácuo com frasco coletor para o peptídeo extraído. A solução final de extração foi liofilizada, para obtenção do material bruto.

Para realizar os experimentos envolvendo o peptídeo OGP e Espectroscopia de Fluorescência foi necessário acoplar à sequência de aminoácidos uma molécula capaz de se excitar pela absorção de radiação UV-Vis, devido à ausência de fluorescência intrínseca na sequência do OGP. Para tanto, foi escolhida a molécula 5,6-carboxifluoresceína (CF, Sigma®), para que fosse acoplada ao término da síntese com os mesmos padrões de acoplamento para os aminoácidos.

A síntese do peptídeo OGP marcado com CF foi desenvolvida pela metodologia da fase sólida nos mesmos moldes que a síntese descrita anteriormente, utilizando DIC/HOBt como agentes de condensação, com um excesso molar em relação ao grau de substituição da peptidil-resina (0,16 mmol.g⁻¹)

de cinco equivalentes para cada reagente em uma mistura de DMF/DCM 9:1; a reação de acoplamento ocorreu à temperatura ambiente por 2 horas. A clivagem final do CF-OGP da respectiva resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada com uma solução contendo 95% TFA, 2,5% Tis e 2,5% água deionizada por 2 horas.

O peptídeo bruto OGP-CF foi precipitado e lavado com éter etílico gelado e extraído empregando uma mistura de acetonitrila e água deionizada (1:1). As sequências obtidas foram purificadas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e caracterizadas por meio de Espectrometria de Massas (MS) e Dicroísmo Circular (CD).

4.3.1. Purificação

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os produtos isolados foram analisados e purificados por HPLC na escala analítica e semi-preparativa, respectivamente, no Laboratório de Síntese de Peptídeos do Instituto de Química de Araraquara. Primeiro, o material bruto foi analisado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com três bombas LC 10AT e injetor automático SIL 10AF, com uma coluna C_{18} em fase reversa (Kromasil, 150 x 4,6 mm; $d = 5 \mu\text{m}$; 300 Å). Nesta análise foram utilizados solventes A (água ultrapura contendo 0,045% de TFA) e B (acetonitrila, Panreac, contendo 0,036% de TFA) empregando um gradiente de 5 a 95% de B em 30 minutos com fluxo de $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, com detecção em 220 nm.

Após análise, o peptídeo bruto foi purificado em modo semi-preparativo utilizando um Cromatógrafo System Gold BECKMAN, com coluna C_{18} de fase reversa (Kromasil, 250 x 21,20 mm; $d = 5 \mu\text{m}$; 100 Å). Foram utilizados os solventes A e B empregando um gradiente ajustado de acordo ao perfil e ao pico de eluição obtidos no cromatograma analítico, que foi de 15 a 60% de B em 120 minutos com fluxo de $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ para o peptídeo OGP e 20 a 60% de B em 120 minutos com fluxo de $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ para o peptídeo OGP-CF, com detecção em 220 nm.

4.3.2. Caracterização

Espectrometria de massas (MS)

Análises das massas dos peptídeos foram realizadas por injeção direta em um Espectrômetro de Massas ESI-MS (Eletrospray Ionization) LC-ESI-MS constituído por um UFLC Shimadzu composto por duas bombas LC 20AD, detector UV-visível modelo SPD 20A, injetor automático modelo SIL 20AHT e um espectrômetro de massas Bruker modelo Amazon SL, no Laboratório de Síntese de Peptídeos do Instituto de Química de Araraquara. A técnica baseia-se em um analisador *ion trap* que ioniza a amostra utilizando um *eletrospray*, obtendo-se ao final um espectro com picos na qual é possível determinar a razão massa molecular/carga (m/z).

Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é um método em biologia estrutural que vem sendo usado desde 1960 para examinar estruturas secundárias de proteínas e peptídeos em solução (WHITMORE; WALLACE, 2007).

A estrutura do peptídeo foi analisada por Espectroscopia de Dicroísmo Circular, em solução tampão 10mmol.L^{-1} Tris-HCl, pH 7,5, com concentração de OGP em $80\mu\text{mol.L}^{-1}$ em temperatura ambiente. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro Jasco modelo CD J-815, pertence ao Instituto de Química de Araraquara, em cubeta de quartzo com aproximadamente $300\mu\text{L}$ de volume e caminho óptico de 1 mm. Os espectros foram registrados com acúmulo de 10 varreduras de 190 a 280 nm, onde foi realizado um branco (solução tampão Tris.HCl 10 mmol.L^{-1}) para cada medida, o qual apresentou sinal desprezível, sendo subtraído mesmo assim de todas as curvas.

4.4. Incorporação do peptídeo CF-OGP nas partículas de sílica mesoporosa

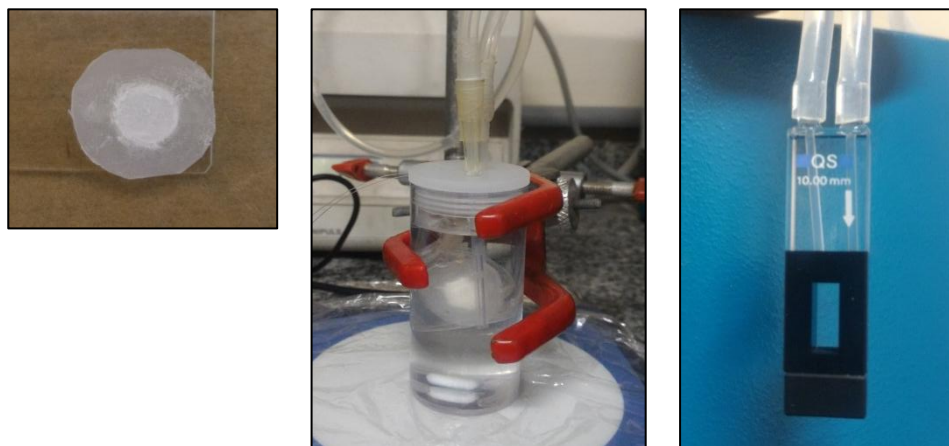
Para a incorporação do peptídeo CF-OGP na superfície porosa das partículas de sílica, 5mg do sólido poroso foi adicionado a uma solução de CF-OGP com concentração de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e mantido por 30 minutos sob agitação lenta, onde de acordo com Mendes et al. (2013) esse é o tempo necessário para a adsorção de CF-OGP se tornar constante. Para análise da eficiência de incorporação, foram realizadas medidas da solução de CF-OGP antes e depois de 30 minutos em contato com as partículas porosas em um Espectrofotômetro de Fluorescência (FS) Varian modelo Cary Eclipse, pertencente ao Laboratório de Síntese de Peptídeos do Instituto de Química de Araraquara, com λ_{exc} em 492nm e λ_{em} em 520nm, comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, referentes à carboxifluoresceína.

4.5. Estudo da liberação de CF-OGP em solução de SBF a partir dos cimentos

Após as amostras de sílica carregadas de CF-OGP se tornaram totalmente secas, foram utilizadas para o preparo dos cimentos e consequente análise da liberação do peptídeo em solução de SBF. O perfil de liberação foi obtido pela imersão desses cimentos em um porta amostra adaptado, com 8mm x 2mm, e envolto por membrana de diálise com 2mL suspenso em 30 mL de solução SBF pH 7,4, a temperatura de 37°C (Figura 7). As aquisições dos dados da quantidade de peptídeo liberada foram realizadas em um sistema fechado acoplado a um Espectrofotômetro de Fluorescência VARIAN modelo Cary Eclipse, com λ_{exc} em 492nm e λ_{em} em 520nm, por meio de mangueiras de silicone ajustadas a uma cubeta de fluxo de 450µL (Hellma QS 10 x 4mm, Figura 7), sendo todo o fluxo mantido por uma bomba peristáltica GILSON modelo Miniplus® 3 com 1 canal, durante as primeiras 24 horas (Figura 8). Após esse período, a solução foi analisada a cada 24 horas até um final de 7 dias de forma pontual, onde todo o volume foi substituído por solução padrão nova depois de cada leitura, a fim de evitar limitações da taxa de liberação por limitações de difusão externas, e manteve-se agitação

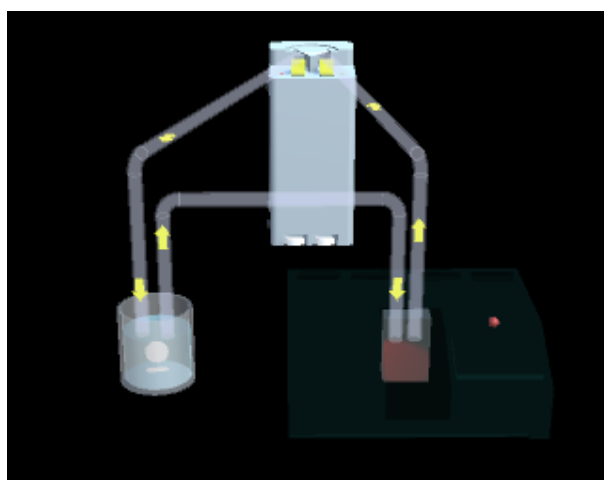
contínua em 100rpm, durante os ensaios de liberação. Os resultados foram analisados considerando a porcentagem do peptídeo CF-OGP liberado em função do tempo e o modelo matemático de Higuchi foi aplicado para determinar a cinética de liberação do peptídeo CF-OGP.

Figura 7. Imagens dos aparatos experimentais utilizados na liberação do peptídeo CF-OGP através da Espectroscopia de Fluorescência.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 8. Imagem esquemática do sistema fechado para obtenção dos dados da liberação do peptídeo CF-OGP por Espectroscopia de Fluorescência.



Fonte: Elaborado pela autora

4.6. Testes in vitro – Cultura celular CHO-K1

Preparação dos cimentos

O componente sólido dos cimentos foi preparado misturando sílica mesoporosa às cerâmicas, na porcentagem de 5%*m*. Cada formulação, sem ou com peptídeo OGP, foi preparada pela mistura do componente pó ao componente líquido (Tabela 4), com ajuda de uma espátula, por 3 minutos. As pastas foram transferidas para seringas e extrudadas em tubos de centrífuga para o preparo dos extratos.

Preparo dos meios de cultura condicionados

O componente pó de cada material foi previamente esterilizado com radiação gama a 15 kGy (Empresa Brasileira de Radiações – EMBRARAD, Cotia, SP) e as pastas foram manipuladas dentro do fluxo laminar para evitar qualquer contaminação. A pasta obtida foi injetada em tubo de centrífuga de 50mL, onde foi adicionado o meio de cultura HAM-F10:D-MEN (1:1) com ausência de soro fetal bovino e mantido a 37°C por 24 horas para o teste de citotoxicidade e 72 horas para os testes de mutagenicidade e genotoxicidade, sob agitação a 133 rpm em estufa incubadora tipo Shaker New Brunswick Scientific modelo Excella E24 Incubator Shaker Series, sendo considerado a razão pó/meio de cultura, 0,2mg.mL⁻¹. Após o tempo de contato com os cimentos, o meio de cultura foi separado, centrifugado a 956 rcf, por 10 minutos e filtrado em filtro de acetato de celulose para seringa estéril, com poro 0,22 µm, considerado extrato original ou 100% (C1), preparando-se diluições seriadas (Tabela 6) em meio de cultura HAM-F10:D-MEN estéril.

Cultura Celular

Para os testes subsequentes foram utilizadas células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) com o objetivo de se fazer uma primeira triagem dos cimentos desenvolvidos. Estes testes foram realizados na Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-Unesp, segundo a norma ISO 10993-5 (2012 - *Biological evaluation of medical devices – Part5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*). A

CHO-K1 foi cultivada e replicada até atingir a terceira passagem em meio de cultura HAM-F10:D-MEN (1:1), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantida em estufa de cultura celular a 37°C, sob uma atmosfera de 5% de CO₂. Os testes de citotoxicidade (XTT) e genotoxicidade (Teste Cometa) foram realizados em placas de cultivo celular e o teste de mutagenicidade, em frasco de cultivo celular. Em todos os testes foram feitas três repetições independentes e cada tratamento (além do controle negativo e do controle positivo) foi realizado em triplicata.

Tabela 6. Divisão dos grupos experimentais de acordo com as concentrações dos extratos para ensaio em cultura celular.

Grupos	Concentrações (cimento/meio de cultura)
C1	0,2 g.mL ⁻¹
C2	0,02 g.mL ⁻¹
C3	0,002 g.mL ⁻¹
C4	0,0002 g.mL ⁻¹

Fonte: Elaborado pela autora

Ensaio de Citotoxicidade (XTT)

Esse teste é baseado na clivagem do sal tetrazolium (sodium 3'-[1(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate)) para formar um corante formazan alaranjado por células metabolicamente ativas devido à atividade de desidrogenases mitocondriais. Desta forma, a quantidade de células viáveis correlaciona-se diretamente com a quantidade de formazan formado, que é solúvel em soluções aquosas e pode ser quantificado por espectrofotometria na região do ultravioleta visível (UV-Vis).

As células foram semeadas ($2,0 \times 10^4$ células) em placas de 24 poços em um volume de 1mL de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. O meio de cultura foi aspirado de cada poço e substituído por 1mL do extrato original e suas diluições, e mantido por 24 horas. O cloridrato de doxorrubicina foi utilizado na concentração de 3,0 µg.mL⁻¹ por

24 horas como controle positivo (CP) e somente o meio de cultura (sem a ação de qualquer tratamento), como Controle Negativo (CN).

Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas com 250 μL de PBS 1 $\times$, e com a câmara de fluxo laminar com a luz apagada, foi colocado em cada poço 1,0 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sem fenol vermelho com 60 μL da solução XTT/electron (Kit-XTT, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) na proporção de 5000 μL :100 μL por poço, deixando a 37°C na estufa por 3 horas. Em seguida, o meio de cultura foi transferido para uma placa de 96 poços, respeitando a mesma distribuição que apresentava na placa de cultura. Foi realizada a leitura colorimétrica em um espectrofotômetro VersaMax modelo Molecular Devices. A absorbância foi medida no comprimento de onda em 492 nm, sendo que a intensidade de absorção foi considerada proporcional ao número de células viáveis em cada tratamento.

Ensaio de Sobrevivência Clonogênica

O Ensaio da Sobrevivência Clonogênica foi estabelecido há quase 60 anos (PUCK; MARCUS, 1956) e permite a avaliação das diferenças na viabilidade reprodutiva, ou seja, a capacidade das células em produzir descendentes e formar colônias, entre as células do controle e as células que sofreram algum tratamento.

Para a realização do ensaio foram semeadas $5,0 \times 10^4$ células CHO-K1 em 1 mL de meio HAM-F10:DMEM na proporção 1:1 suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO_2 por 24 horas. Após esse período, o extrato original e suas diluições foram colocados em contato com as células por mais 24 horas. Cada poço recebeu posteriormente uma suplementação de 100 μL de SFB, com exceção do controle positivo (cloridrato de doxorrubicina, $0,3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Todos os tratamentos, os CN e CP foram realizados em triplicata.

Ao final do período de tratamento, os extratos e o meio de cultura foram removidos de cada poço, lavados com 1 mL de PBS 1 $\times$ e as células foram desprendidas por tripsinização e transferidas para câmara de Neubauer. Para esse ensaio, 150 células foram semeadas em cada frasco de cultivo celular de 25 cm^2 com 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB, além dos controles

negativos e positivos. Após 7 dias de cultivo, as células foram lavadas com PBS 1× e as células fixadas com uma solução composta por metanol:ácido acético:água destilada (1:1:8), por 30 minutos. As colônias foram coradas com 5mL de corante Giemsa diluído em solução tampão fosfato (Na_2HPO_4 $0,06\text{mol.L}^{-1}$ e KH_2PO_4 $0,06\text{mol.L}^{-1}$ – pH 6,8) na proporção de 1:20, por 20 minutos. As células foram lavadas com água destilada, para remover o excesso de corante e as colônias foram contadas com auxílio de lupa (aumento 16×). O número de colônias no grupo controle negativo foi considerado 100%. A partir desse parâmetro, foram realizados os cálculos das frações de sobrevivência (FS), de acordo com a Equação (6), onde *ct* é o número de colônias em cada tratamento e *cn*, colônias encontradas no controle negativo.

$$FS = \frac{ct}{cn} \times 100 \quad \text{eq.(6)}$$

Ensaio de Mutagenicidade – Teste Micronúcleo

O micronúcleo (MN) é um núcleo acessório, originado a partir de fragmentos de cromossomo ou de cromossomos inteiros que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose e surgem por alterações genéticas espontâneas ou são induzidos por agentes genotóxicos, por isso tem sido utilizado como uma ferramenta na avaliação de biomateriais (CHAUVEL-LEBRET et al., 2001).

O teste micronúcleo foi realizado de acordo com uma adaptação da metodologia descrita por Fenech (2000). A partir do terceiro subcultivo celular, 37×10^4 células foram subcultivadas em garrafas de 25 cm^2 , contendo 5mL de meio de cultura HAM-F10:DMEM (1:1), sendo uma garrafa para cada material. O tratamento com os extratos originais e as diluições foi realizado por 24 horas, além do controle negativo. O controle positivo utilizado foi o cloridrato de doxorubicina ($0,15\mu\text{g.mL}^{-1}$). Foram adicionados 25μL de citocalasina B (1mg.mL^{-1}) em cada garrafa por 24 horas, para interromper a citocinese.

Após esse período, as células foram lavadas, tripsinizadas, e o conteúdo das garrafas foi centrifugado em tubo de centrífuga de 15mL por 7 minutos. O pellet de células foi ressuspensionado em solução hipotônica KCl 0,3% por 5 minutos. Essa

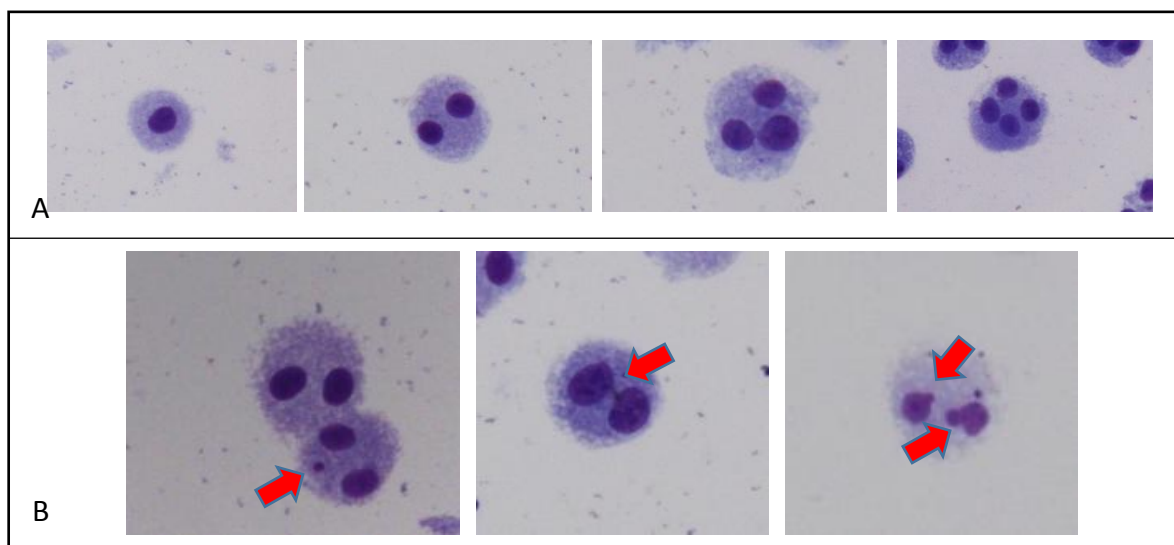
suspensão celular foi centrifugada novamente e ressuspensa em 3 mL de solução fixadora com metanol: ácido acético (3:1) juntamente com 200µL de formol 1% e cuidadosamente homogeneizado com uma pipeta tipo Pasteur. Após nova centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e a suspensão gotejada em 2 lâminas previamente limpas em metanol e mantidas em água destilada gelada. As lâminas foram coradas com solução Giemsa 3% diluída em solução tampão fosfato por 7 minutos, lavadas em água destilada e secas, a temperatura ambiente.

Para a determinação de índice de divisão nuclear (IDN), 500 células viáveis com citoplasma bem preservado com 1 a 4 núcleos (Figura 5a) foram contadas por lâmina codificada com o auxílio de um microscópio óptico Leica modelo DM500. O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker (1989) através da equação (7), onde $M1$ a $M4$ é o número de células com 1, 2, 3, 4 núcleos, respectivamente; n é o número total de células viáveis.

$$IDN = \frac{[M1+2(M2)+3(M3)+4(M4)]}{N} \quad \text{eq(7)}$$

Além disso, 1000 células binucleadas foram analisadas quanto a frequência de micronúcleos (FBMN) (TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992; FENECH, 2000), obedecendo aos seguintes critérios: estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante a do núcleo principal; borda evidente, sugerindo membrana nuclear; ter formato arredondado; localização intracitoplasmática; diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal. Além disso, foi analisado a frequência de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares (Figura 9).

Figura 9. Tipos celulares analisados no Teste do Micronúcleo. (A) Células com 1 a 4 núcleos, respectivamente; (B) Célula binucleada com micronúcleo, ponte nucleoplasmática e broto nuclear, respectivamente, indicados por setas.



Fonte: Elaborado pela autora

Ensaio de Genotoxicidade – Teste Cometa

O princípio do Teste Cometa ou eletroforese em gel de núcleo individual (SCGE – Single-Cell Gel Electrophoresis) está fundamentado na capacidade de fragmentos de DNA desnaturados ou clivados migrarem para exterior da célula sob a influência de uma corrente elétrica, onde o DNA íntegro migra mais lentamente e permanece dentro dos limites do núcleo (MONTALDI, 2009).

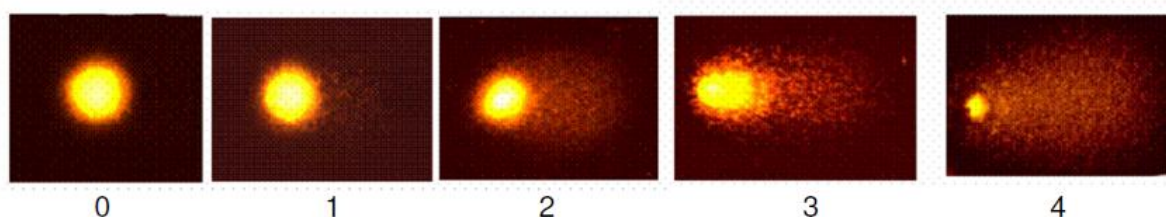
Para esse ensaio, foi utilizada a versão alcalina segundo a metodologia descrita por Singh e colaboradores (1988). Para tanto, a quantidade de 27×10^3 células foram semeadas em 1mL de meio HAM-F10:DMEM (1:1) suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Os tratamentos foram realizados por 24 horas da mesma forma que os ensaios anteriores. O Controle Positivo constou de solução de peróxido de hidrogênio 80μmol.L⁻¹ por 5 minutos. Ao final do tratamento, os poços de cultivo celular com os extratos foram lavados em 1mL de PBS 1×. Em seguida, as células foram desprendidas por tripsinização, sendo transferidas 500μL da suspensão celular para um microtubo para centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e o centrifugado foi homogeneizado com 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão em volume suficiente para 200μL,

que foi igualmente dividido e aplicado em 2 lâminas histológicas pré-gelificadas com 1,5% de agarose com ponto de fusão normal. Em seguida, foram cobertas com lamínulas e deixadas na geladeira por 10 minutos, quando após cuidadosa retirada da lamínula, as lâminas foram imersas em uma solução de lise por pelo menos 12 horas protegidas da luz em geladeira. Posteriormente, as lâminas ficaram imersas em tampão de eletroforese alcalino (pH 13,0) por 20 minutos para desnaturação do DNA, para então ser realizada corrida em eletroforese a 43V e 308 mA por 25 minutos. Ao final, as lâminas foram transferidas para uma recipiente contendo tampão de neutralização (solução Tris-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, protegidas da luz em geladeira. As lâminas foram secas à temperatura ambiente, e então, fixadas em etanol absoluto. Para a coloração do material, foram adicionados 30µL de solução de brometo de etídio ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) sobre a lâmina, sendo esta coberta por uma lamínula.

A análise foi feita em microscópio de fluorescência Leica modelo DMLB, filtro 516-560, em aumento de 40×, pertencente ao Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-Unesp. Foram analisados 450 nucleóides por tratamento, sendo observadas as células com contorno circular (sem danos) ou em forma de “cometa”, no qual a extensão da cauda está relacionada à distância de migração dos fragmentos de DNA, seguida de captura de imagem digital por uma câmera Leica modelo DC 300F. As imagens dos nucleóides foram classificadas nas seguintes categorias apresentadas na Figura 10, permitindo a obtenção do Índice de Danos no DNA (IDD) de acordo com Equação (8).

$$IDD = \frac{[(C0 \times 0) + (C1 \times 1) + (C2 \times 2) + (C3 \times 3) + (C4 \times 4)]}{N} \quad \text{eq.(8)}$$

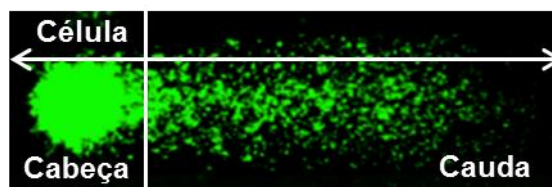
Figura 10. Classificação de danos celular. 0 (sem danos, <5%); 1 (baixo nível de danos, 5-20%); 2 (médio nível de danos, 20-40%); 3 (alto nível de danos, 40-95%); 4 (dano total, >95%).



Fonte: KOBAYASHI, H. et al. (1995).

As imagens obtidas pelo microscópio de fluorescência foram analisadas pelo software Comet Score, obtendo-se a porcentagem de DNA na cauda, que corresponde a quantidade de DNA fragmentado, e do *Tail moment*, que permite relacionar a quantidade de DNA fragmentado com a distância que os fragmentos migraram durante a eletroforese (Figura 11; MOLLER, 2005).

Figura 11. Típica célula “cometa” mostrando os parâmetros de análise: cabeça e cauda.



Fonte: Adaptado de SASKA et al. (2015).

4.7. Testes in vitro – Cultura celular MC3T3-E1

Preparação dos cimentos

O componente sólido dos cimentos foi preparado misturando sílica mesoporosa às cerâmicas, na porcentagem de 5% em massa. Cada formulação, sem ou com peptídeo OGP, foi preparada pela mistura do componente pó ao componente líquido (Tabela 4), com ajuda de uma espátula, por 3 minutos. As pastas foram transferidas para seringas e extrudadas em tubos de centrífuga para o preparo dos extratos.

Preparo dos meios de cultura condicionados

Os testes de proliferação e mineralização foram realizados na Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB-USP, segundo a Norma ISO 10993-5 (*Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*). O componente pó de cada material foi previamente esterilizado com radiação gama a 15 kGy (EMBRARAD) e as pastas foram manipuladas dentro do fluxo laminar para a manutenção da assepsia. A pasta obtida foi injetada em tubo de centrífuga de 50mL, onde foi adicionado o meio de cultura α -MEM 10% SFB e mantido a 37°C por 24 horas, sendo considerado a razão cimento/meio de cultura, 0,2mg.mL⁻¹. Após o tempo de contato com os cimentos, o meio de cultura foi separado, centrifugado a 3000 rpm, 25°C por 10 minutos e filtrado em filtro de acetato de celulose para seringa estéril, com poro 0,22 μ m, considerado extrato original ou 100% e preparado as diluições seriadas, de acordo com a Tabela 6.

Cultura Celular

Células de linhagem pré-osteoblástica murina MC3T3-E1 (ATCC® CRL-2594™) foram cultivadas em meio de cultura α -MEM (Minimum Essential Medium α - Gibco, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino - Gibco), e incubadas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Após atingirem a subconfluência as células foram subcultivadas utilizando-se a enzima tripsina, responsável por dissociar as células do frasco de cultura (0,25% tripsina; 1mmol.L⁻¹ EDTA), mantidas por 5 minutos na estufa de CO₂ a 37°C, em seguida a tripsina foi inativada com α -MEM 10% SFB. As células foram transferidas para um tubo de centrífuga de 15 mL e centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram diluídas em um novo meio α -MEM 10% SFB. Após isso, fez-se a contagem celular através do protocolo do azul de tripan, corante responsável por corar as células inviáveis, em câmara de Neubauer. Posteriormente, as células foram utilizadas para os ensaios de viabilidade celular e mineralização.

Análise da viabilidade celular

Para os ensaios de viabilidade foram plaqueadas 3×10^3 células/poço em placas com 96 poços. Após a incubação por 24 horas, o meio de cultura α -MEM 10% SFB foi substituído pelo meio condicionado com os cimentos testados, além do controle positivo (α -MEM 10% SFB) e controle negativo (água destilada filtrada). Os ensaios de redução do MTT e de cristal violeta foram realizados nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

A análise da atividade mitocondrial das células foi realizada pelo método da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich). Esse teste quantificou a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, foi solubilizado e, então, sua concentração foi determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983). No período experimental de 24 horas os poços foram lavados com PBS 1×, em seguida as células foram incubadas numa solução de 1 mg de MTT para 1ml de α -MEM sem SFB, essa solução foi preparada no momento do seu uso e foi filtrada em filtro de seringa com 0,22 μ m (TPP- Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) antes de ser adicionado nas placas. Após esses procedimentos, as placas foram deixadas por 4h a 37°C; em seguida removeu-se a solução, o pigmento insolúvel reduzido intracelularmente foi extraído com DMSO (dimetilsulfóxido - Synth) e deixado em temperatura ambiente por 30 minutos. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro BioTek modelo Synergy™ a 562nm.

O ensaio de cristal violeta é responsável por corar os ácidos nucléicos das células (KUENG et al., 1989). No período experimental de 24 horas, os meios de cultura de todos os grupos experimentais foram removidos e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1×. Em seguida foi adicionado metanol 100% durante 10 minutos. Após esse período retirou-se o metanol e adicionou-se a solução de cristal violeta 0,2% em etanol 2% por 3 minutos. Feito isso, removeu-se a solução e se lavou duas vezes os poços com PBS 1× para remover o excesso do corante. Por fim, acrescentou-se a solução de citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ em etanol 50% durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro Synergy™ BioTek a 540nm.

Ensaio de mineralização in vitro

Para avaliar qualitativamente os efeitos dos cimentos, com ou sem sílica e peptídeo, na mineralização de pré-osteoblastos, as células foram submetidas à diferenciação osteogênica e a deposição de cálcio foi avaliada por meio da coloração com vermelho de alizarina. Para isso, as células MC3T3-E1 foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 em placas de 24 poços. Após a aderência, as mesmas foram cultivadas com meio α -MEM 10% SFB; suplementado com ácido ascórbico ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich), β -glicerolfosfato (10 mmol.L^{-1} , Sigma-Aldrich) e com os extratos dos cimentos testados. As trocas de meio foram realizadas a cada 3 dias. A mineralização foi avaliada por coloração com Alizarina Red S (Sigma-Aldrich). Após 14 e 21 dias de cultivo, os pré-osteoblastos tiveram os sobrenadantes descartados, foram lavados com PBS 1 $\times$ e posteriormente fixados com formaldeído 4% por 5 minutos em temperatura ambiente. Por fim, as células foram incubadas com solução com 2% de alizarina, em pH 4,2 por 10 minutos, seguida de três lavagens com água deionizada.

Análise estatística

Para cada material investigado, os resultados provenientes dos testes in vitro obtidos dos três experimentos independentes e em triplicata foram submetidos ao teste de Kolgomorov/Smirnov para avaliar se os dados obedeciam à distribuição normal. Como os dados apresentavam aderência à curva normal, foi aplicada a análise de variância ANOVA one-way, seguido do teste de Tukey. Para tanto, foi utilizado o programa Graphpad Prisma versão 5.01 e os testes foram considerados ao nível de significância de 5%.

4.8. Testes in vivo

Para os testes com animais, optou-se em realizá-los somente com um tipo de cimento, aquele que apresentasse melhores características físico-químicas e no ambiente in vitro. Assim, o grupo dos cimentos CaPs foram os escolhidos para serem analisados no teste in vivo.

Preparação do cimento

O componente sólido dos cimentos foi preparado adicionando sílica mesoporosa na porcentagem de 5% em massa, à uma pré-mistura de β TCP-MCPM. Cada cimento, sem ou com sílica e peptídeo OGP, foi preparado pela mistura do componente pó ao componente líquido, uma solução de polietilenoglicol 400 (PEG400) (Tabela 4), com ajuda de uma espátula por 3 minutos. As pastas foram transferidas imediatamente às seringas de 1mL para serem usadas no preenchimento do defeito ósseo. Os materiais foram esterilizados por radiação gama (sólidos) e por contato com luz UV (líquido) previamente ao uso. Os materiais cirúrgicos foram esterilizados por autoclave.

Procedimento cirúrgico

Os estudo in vivo consistiu de 80 ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Holtzman), adultos, machos, com peso médio de 220 gramas, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-Unesp. Os animais foram aleatoriamente separados em grupos de igual número e mantidos em gaiolas plásticas, em uma ambiente com temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade (65-75%) controladas e ciclo de luz (12 horas claro e 12 horas escuro) e alimentados com água e ração *ad libitum* no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCFAr-Unesp. Os grupos e seus tratamentos correspondentes estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7. Divisão dos animais em grupos de acordo com o material.

Grupo	Material
Controle	Coágulo sanguíneo
CaP	β -TCP + MCPM
CaPSi	β -TCP + MCPM + sílica mesoporosa
CaPSi-OGP	β -TCP + MCPM + sílica + peptídeo OGP

Fonte: Elaborado pela autora

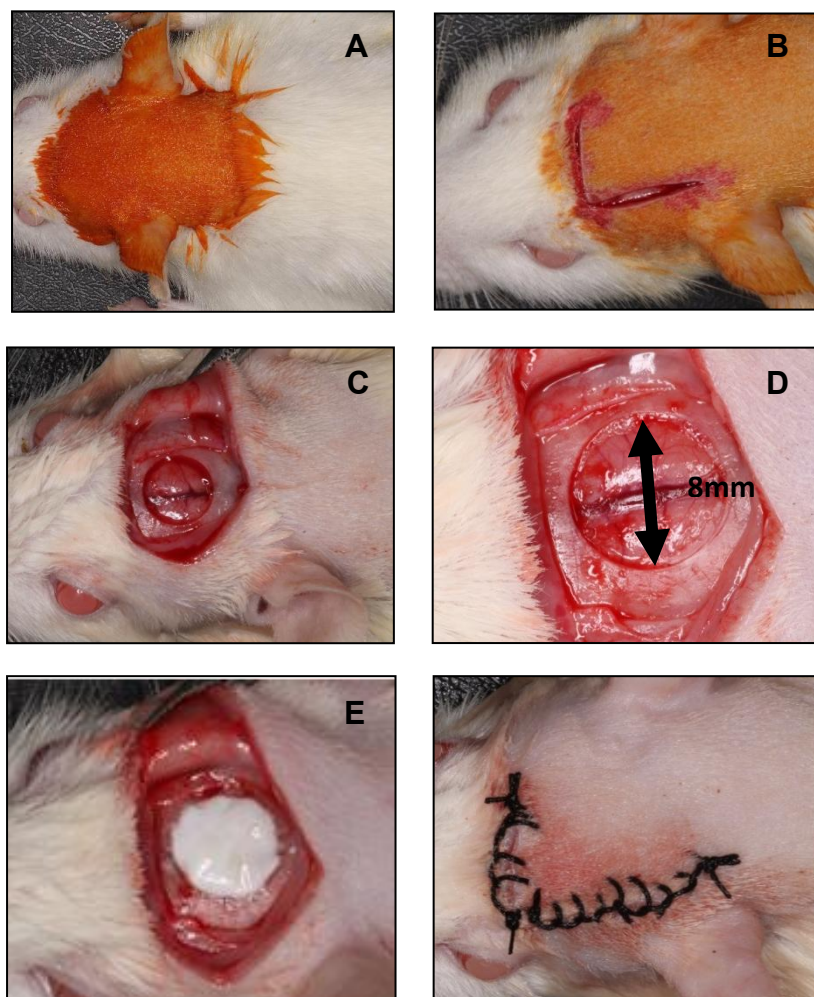
O experimento foi realizado dentro dos padrões da ASTM F981-04 (2010 - *Standard Practice for Assessment of Compatibility of Biomaterials for Surgical Implants with Respect to Effect of Materials on Muscle and Bone*), o qual foi aprovado na Comissão no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp (Protocolo CEUA/FCF/CAr 31/2012 - Anexo 1 e 2).

Em cada animal foi realizado um defeito no osso parietal, onde foram preenchidos por um tipo de material (Tabela 7), exceto o defeito controle que foi preenchido somente pelo coágulo sanguíneo (Grupo Controle). Os animais foram divididos em quatro períodos de análise: 15, 30, 60 e 120 dias, sendo utilizado 5 animais por grupo/período.

Os animais foram anestesiados por meio de administração intramuscular de cloridrato de ketamina (25mg.kg^{-1} ; Ceva) e cloridrato de xilazina (5 mg.kg^{-1} ; Ceva), dosagem suficiente para 30 minutos de anestesia. Após a anestesia e tricotomia da região parietal, os animais foram acomodados em posição dorsal (Figura 12a), onde receberam a incisão na região parietal nas direções ântero-posterior e látero-lateral (em “L”) (Figura 12b), seguida de deslocamento e rebatimento dos tecidos contendo epiderme, tecido muscular e periósteo, até a exposição do osso parietal.

Os defeitos ósseos críticos foram realizados com o auxílio de uma trefina com 8,0 mm de diâmetro (Neodent®), sob irrigação constante de soro fisiológico 0.9%. A confecção dos defeitos consistiu na perfuração total do osso parietal mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura 12c e 12d). O defeito no osso parietal foi preenchido por um dos cimentos de acordo com a divisão dos grupos (entre 50-60 μL de cimento; Figura 11e; Tabela 7), que foram previamente preparados em capela de fluxo e inseridos em seringas de 1 mL. No pós-operatório foi administrado Tramadol, na dosagem de $12,5\text{ mg.kg}^{-1}$, em dose única por via intraperitoneal, pós-efeito anestésico, segundo Cannon e colaboradores (2010). A sutura do segundo plano foi realizada através de pontos simples com Vicryl 4-0 (Ethicon, Johnson&Johnson) e o primeiro plano foi suturado através de pontos contínuos com Mononylon 3-0 (Ethicon, Johnson&Johnson) (Figura 12f).

Figura 12. Procedimento cirúrgico. (A) tricotomia; (B) incisão com lâmina de bisturi nº 15 sob o osso parietal; (C) perfuração total do osso parietal mantendo-se a integridade da dura-máter; (D) defeito de tamanho crítico (8 mm); (E) sutura através de pontos contínuos com fio Mononylon 3-0.



Fonte: Elaborado pela autora

A eutanásia dos animais foi realizada nos períodos de acompanhamento pré-determinados por sobre dose anestésica. O procedimento foi realizado, primeiramente, por meio de anestesia com a administração intramuscular de cloridrato de ketamina (25mg.kg^{-1}) e de cloridrato de xilazina (5mg.kg^{-1}) e após remoção dos ossos parietais, foi realizado o aprofundamento anestésico e, em seguida, as peças foram fixadas em solução de formol tamponado 10% por 48 horas; posteriormente, as peças foram transferidas para uma solução de etanol a 70% sendo conservadas a temperatura ambiente. As peças foram radiografadas antes de serem encaminhados para o processo histotécnico de rotina para coloração em hematoxilina e eosina (HE).

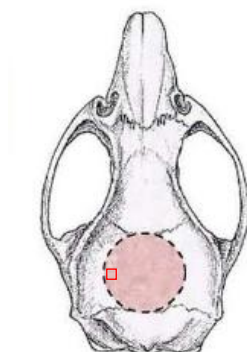
Análise radiográfica dos espécimes ex vivo

As imagens radiográficas foram realizadas após os animais serem eutanasiados. A análise consistiu em observar o fechamento dos defeitos nos períodos pré-determinados e obter os valores de densidade do osso neoformado na margem dos defeitos.

Os exames radiográficos foram realizados utilizando o sistema digital DenOptix QST (Gendex Dental Systems, Des Plaines, IL) com placa de fósforo no tamanho 2 (31 x 41 cm) e utilizando aparelho de raios X FOCUS com 7mA, 70 kV e 0.062s e 0.05s, no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-Unesp. A distância do cilindro localizador à placa de fósforo foi padronizada em 40 cm. As placas de fósforo foram escaneadas e as imagens digitalizadas por um *scanner* Agfa modelo SnapScan 1236, numa resolução de 300dpi.

As imagens radiográficas foram analisadas em relação à média da densidade em comparação com a densidade da escala de alumínio (espessura de 0,5 a 3,5 mm), radiografada junto aos espécimes, através do software VIXWIN 2000 (Gendex, Deplanes, IL, EUA). A área da borda do defeito, nas dimensões de 1mm x 1mm, foi selecionada para análise em todas as imagens, de acordo com a Figura 13.

Figura 13. Imagem esquemática do *template* utilizado para as análises de densidade através das radiografias da calota dos ratos.



Fonte: Elaborado pela autora

Após a determinação do valor de densidade óptica dessa área, os valores foram convertidos em equivalência à mmAl através da equação 9, onde DO_a é a densidade óptica da amostra, ES é a espessura correspondente à escala de alumínio e DO_e é a densidade óptica da escala (GUERREIRO-TANOMARU et al., 2009).

$$Eq\ Al = DO_a \times \frac{ES}{DO_e} \quad eq(9)$$

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Graphpad Prisma versão 5.01. O teste ANOVA foi realizado para avaliar os valores mensurados para densidade, seguido do Teste de Turkey para comparações múltiplas, com nível de significância de 5%.

Processamento histotécnico

Após a obtenção das imagens por radiografia, as peças foram desmineralizadas em solução EDTA a 7%, em pH 7,2, trocada a cada 48 horas durante 60 dias. Após o período de descalcificação os espécimes foram lavados em água corrente por 2 horas. Decorrido este período, os materiais foram imersos nas seguintes soluções: álcool 70% por 12 horas, álcool 90% por 1 hora, álcool absoluto por 4 horas (realizando trocas a cada hora), solução álcool-xilol (1:1), seguido de imersão em xilol por 2 horas (realizando troca a cada 1 hora) e inclusão final em parafina.

As peças incluídas em blocos de parafina foram cortadas de forma semi-seriada com 6 μ m de espessura em micrótomo Microm modelo HM325, no Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-Unesp. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro previamente lavadas em banho de ultrassom com álcool absoluto. Ao final dos cortes de cada bloco, as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C para a fixação dos cortes, por 2 horas, antes de passar pelo processo de coloração.

Análise Histomorfométrica

Após as lâminas serem tiradas da estufa e estabelecerem-se a temperatura ambiente, foram dispostas em suporte apropriado para coloração em soluções Hematoxilina de Carazzi e Eosina de Lison (HE) para análise descritiva, no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-Unesp. Os cortes histológicos foram analisados e fotografados em um microscópio óptico Leica Reichert modelo DIASTAR, com objetiva para aumento de 2,5, 10 e 40 vezes e oculares com aumento de 10 vezes, acoplado a uma câmera de vídeo modelo DXC-1107A/107AP Sony Eletronics Inc, pertencentes ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-Unesp. Os parâmetros analisados foram: 1. qualidade do osso mineralizado; 2. atividade celular incluindo a presença de osteoblastos ativos, matriz osteóide e osteoclastos; 3. evidência de formação de tecido conjuntivo fibroso dentro do defeito ósseo; 4. processo de angiogênese; 5. reação inflamatória; 6. degradação dos cimentos. Estes parâmetros foram analisados por um único pesquisador. A resposta inflamatória observada na análise dos cortes histológicos foi mensurada utilizando a Tabela 8 de parâmetros de acordo com a ASTM F981-04.

Tabela 8. Classificação para intensidade de reação inflamatória presente nos espécimes.

Classificação	Escore
Ausente	0
Muito leve	1
Leve	2
Moderada	3
Intensa	4

Fonte: ASTM F981-04

A análise histométrica foi realizada com o intuito de avaliar a porcentagem de fechamento do defeito crítico, utilizando o Software Image J (U. S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA).

De cada peça foram executados cortes que se iniciaram na região mediana do defeito. Foram removidas 10 lâminas com 5 cortes cada, sendo que para cada

corte captado, 4 eram excluídos, o que forneceu uma distância de 24µm de cada corte obtido. De cada amostra, optou-se de forma aleatória por corar as lâminas de números ímpares (1, 3, 5, 7, 9). As imagens dos cortes histológicos foram obtidas por meio do microscópio óptico Leica modelo Reichert Diastar em um aumento de 2,5 vezes.

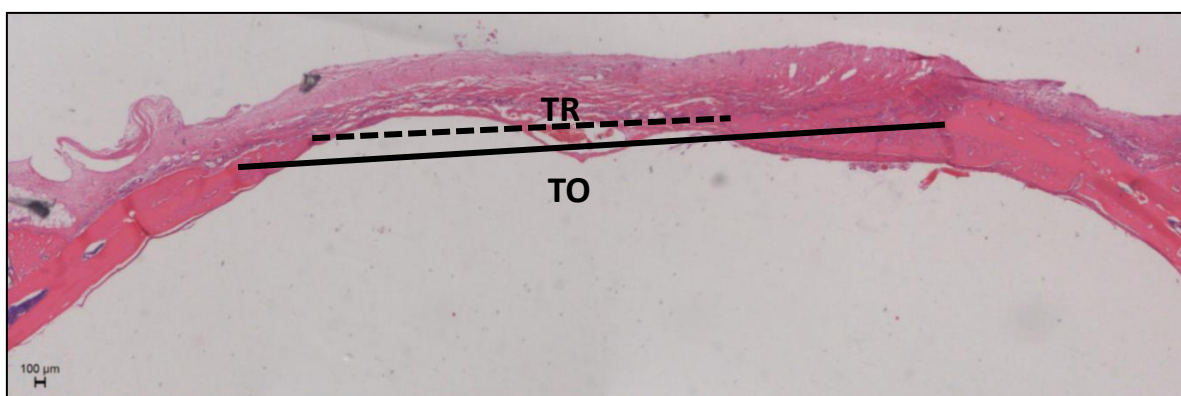
Para avaliação da porcentagem de fechamento do defeito crítico (FD), uma medida linear foi executada na porção mediana do defeito, onde foi mensurado inicialmente o tamanho original (TO) e o tamanho remanescente do defeito (TR) (Figura 14), sendo que a porcentagem de fechamento foi obtida pela equação (10):

$$FD = \frac{TR - TO}{TO} \times 100 \quad \text{eq.(10)}$$

A porcentagem de preenchimento ósseo (PO) foi avaliada pela análise área total do defeito (AT) e da área de formação óssea (AO) (Figura 15) e determinada pela equação (11):

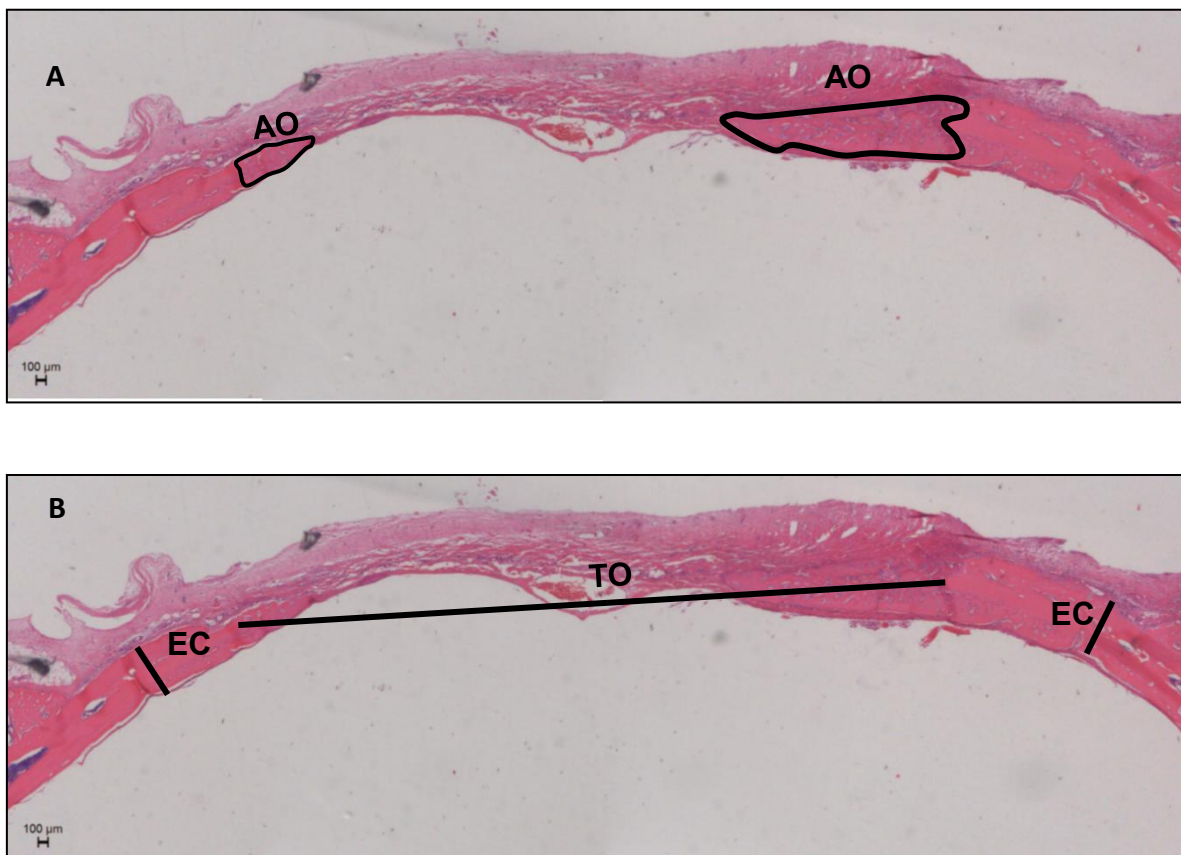
$$PO = \frac{AO \times 100}{AT} \quad \text{eq.(11)}$$

Figura 14. Porcentagem de fechamento do defeito crítico. TO: Tamanho Original do defeito; TR: Tamanho Remanescente do defeito.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 15. Porcentagem de preenchimento ósseo. (A) área de formação óssea (AO) obtida através da soma das áreas onde se observou formação óssea. (B) área total do defeito (AT) foi definida pela multiplicação da espessura do crânio do animal (EC) pelo tamanho total do defeito (TO).



Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados da análise histométrica foram numéricos e, devido a isso, foi aplicado um teste de normalidade de Kolgomorov/Smirnov para detectar se os dados se distribuíram de acordo com o teorema da distribuição central. Como o teste determinou que os dados estavam distribuídos de acordo com a normalidade, testes paramétricos foram utilizados para a análise estatística inferencial. O teste *t* não pareado foi aplicado para comparação entre os grupos em diferentes períodos experimentais e dentro de cada grupo variando-se os períodos experimentais. O software GraphPad Prism 5 foi utilizado para a análise estatística desse estudo, e todos os testes foram aplicados ao nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão apresentados os resultados de caracterização das partículas de sílica mesoporosa e dos cimentos preparados com e sem essas partículas. Além disso, serão apresentados os resultados obtidos com a síntese do peptídeo OGP e a liberação dessa molécula a partir das partículas de sílica presente nos cimentos. E por final os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

5.1. Caracterização das partículas de sílica

A síntese do material mesoporoso foi bem estudada e caracterizada por Mendes e seus colaboradores (2013). O objetivo de ser caracterizado novamente foi de monitorar sua característica mesoporosa em relação à metodologia de síntese. Assim, o material foi analisado pelas técnicas que forneceriam informações quanto a porosidade do mesmo, como adsorção e dessorção de N_2 , espalhamento de raios X à baixo ângulo e microscopia eletrônica de transmissão.

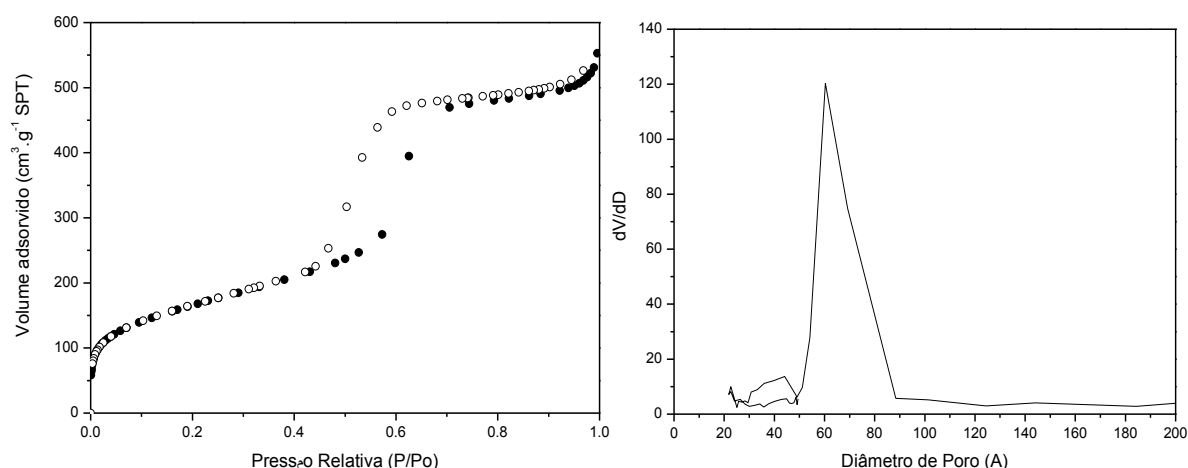
A área da superfície específica é definida como sendo a superfície de área por unidade de massa ou volume de um material e sugere a extensão da superfície do material disponível a interações físicas e químicas (REED, 1995). Em estudos de caracterização, na determinação da superfície de área específica de pós cerâmicos, metálicos ou poliméricos, utiliza-se normalmente o método BET, que leva esse nome em homenagem aos seus idealizadores, Brunauer, Emmet e Teller. O método consiste na absorção física de um gás inerte a baixa temperatura, que passa rapidamente através da amostra, sendo o N_2 no ponto de ebulição (77,4 K) em geral o mais utilizado (BROEKHOFF; BOER, 1968). As curvas de adsorção-dessorção de nitrogênio e dD/dV em função do diâmetro de poro, apresentadas na Figura 16, permitem observar o tamanho médio de poros das partículas de sílica mesoporosa.

A isoterma é do tipo IV, com um ciclo de histerese e característico de materiais mesoporosos SBA-15 (ZHAO, D. et al., 1998), que exibe uma estrutura característica de materiais mesoporosos estruturados por micelas (MTS), onde em determinado valor da pressão relativa P/P_0 o volume aumenta bruscamente,

formando um loop de histerese (BECK et al.,1992). A histerese apresentada pode ser classificada como do tipo H1, na curva de adsorção e dessorção entre a pressão parcial P/P_0 de 0,4-0,7, característica de poros uniformes (MANZANO et al., 2008; IZQUIERDO-BARBA et al., 2009) com canais 1 D cilíndricos. Sua presença é devido ao preenchimento incompleto dos mesoporos e quanto menor sua inclinação mais homogênea é a distribuição do tamanho dos poros.

A porosidade deste material apresenta tamanho médio de poros de 60 Å. A amostra apresenta também uma distribuição fina de poros e alta área de superfície específica, calculada em $879 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

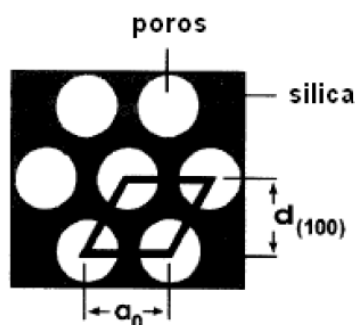
Figura 16. Isoterma de adsorção (círculo sólido)/dessorção (círculo aberto) de nitrogênio da sílica mesoporosa pura calcinada, obtida a partir de P123.



Fonte: Elaborado pela autora

O espalhamento de raios X a baixo ângulo quando aplicado a materiais mesoporosos fornece as dimensões médias da unidade de repetição da estrutura. Deve-se considerar que o arranjo dos átomos na sílica mesoporosa não é cristalino, assim o único elemento de ordem estrutural é a disposição periódica dos canais paralelos. Portanto, as reflexões observadas no difratograma são atribuídas a essa disposição (ROCHA, L. A., 2010). Sua estrutura interna é constituída de um arranjo de cilindros mesoporosos e é caracterizada por valores de espaçamento interplanar d_{100} e parâmetro de célula unitária a_0 (Figura 17).

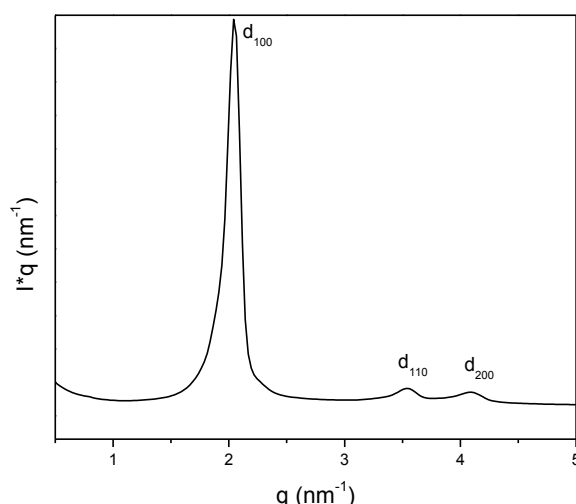
Figura 17. Representação esquemática da estrutura dos materiais mesoporosos hexagonais.



Fonte: Marker et al. (1996).

A caracterização por SAXS da amostra de sílica mesoporosa está apresentada na Figura 18, mostrando que o material poroso preparado em pH 1,5 apresenta uma estrutura hexagonal bem ordenada. Foram observados três sinais de difração correspondentes aos planos com Índice de Miller (hkl) de (100), (110) e (200) típicos de SBA-15. Esses sinais de difração observados são atribuídos à disposição periódica dos canais paralelos e são típicos de materiais mesoporosos com arranjo hexagonal. Pode ser observado que o material poroso exibe uma difração principal próximo a $2,0 \text{ nm}^{-1}$ com o espaçamento interplanar d_{100} igual a 3,08 nm, (110) a $d_{110} = 1,77 \text{ nm}$ e (200) a $d_{200} = 1,53 \text{ nm}$, correspondendo a um valor de célula unitária a_0 igual a 3,55 nm.

Figura 18. Difratograma de SAXS da amostras de sílica mesoporosa.



Fonte: Elaborado pela autora

A Tabela 9 apresenta a união dos dados obtidos por BET e por SAXS que caracterizam as partículas de sílica mesoporosa.

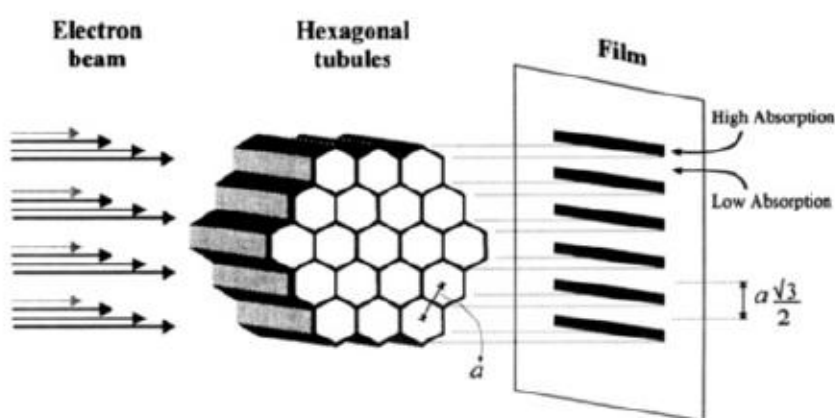
Tabela 9. Dados obtidos por SAXS e BET.

	d_{100}	a_0	D_p (nm)	S_{BET} (m ² .g ⁻¹)	Estrutura
Sílica Mesoporosa	3,08	3,55	6,0	879,0	Hexagonal

Fonte: Elaborado pela autora

Os materiais mesoporosos permitem a obtenção de imagens por TEM, porque durante a passagem dos elétrons através de uma lâmina fina do sólido mesoporoso ocorre espalhamento dos elétrons em praticamente todas as direções. Se o feixe de elétrons incide perpendicularmente ao eixo dos tubos paralelos, a projeção da densidade de espalhamento é periódica e linhas paralelas equidistantes são observadas. Chenite, Le Page e Sayari (1995) mostraram que a estrutura hexagonal é regular o suficiente para projetar linhas paralelas equidistantes e que a distância entre essas linhas é dada por uma relação apresentada na Figura 19, onde a é a distância do centro de um tubo ao centro do outro.

Assim, se o feixe de elétrons não incidir perpendicularmente ao eixo dos tubos, essa estrutura desaparece porque a projeção da densidade de espalhamento não será mais periódica. Por outro lado, quando o feixe de elétrons incide na direção paralela ao eixo dos tubos, a estrutura hexagonal dos poros pode ser observada.

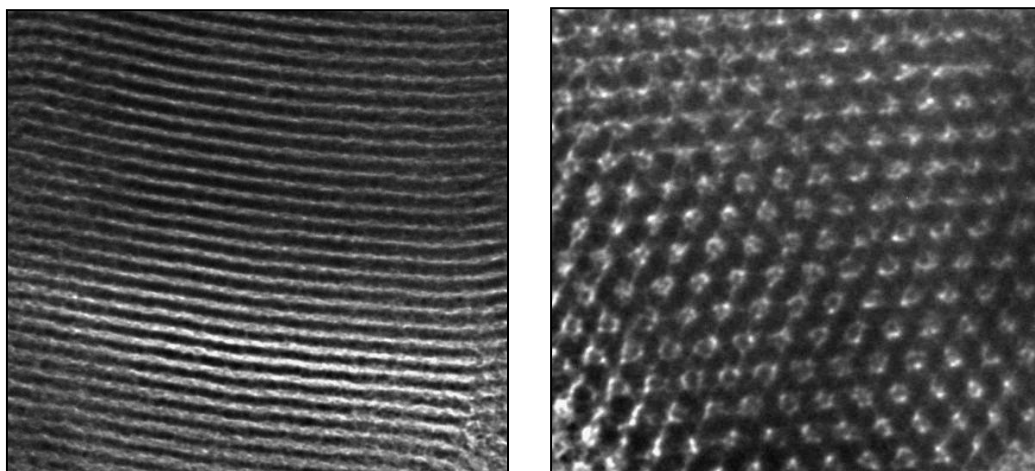
Figura 19. Modelo esquemático mostrando aparente "estrutura lamelar" a partir de uma projeção de um arranjo hexagonal de túbulos.

Fonte: Chenite; Le Page; Sayari (1995).

A Figura 20 apresenta imagens de TEM para a amostra de sílica mesoporosa, onde feixe incidente está na direção perpendicular e paralela ao eixo dos poros,

respectivamente, ilustrando a organização dos canais das partículas de sílica. Verificaram-se poros alinhados com estruturas hexagonais definidas, corroborando com os resultados obtidos por SAXS.

Figura 20. Imagens de TEM da amostra sílica mesoporosa, perpendicular e paralelo ao eixo dos poros.



Fonte: Elaborado pela autora

5.2. Caracterização dos cimentos cerâmicos com e sem partículas de sílica mesoporosa

Testes de manipulação dos cimentos

Para o preparo dos cimentos em pastas, foram realizados vários testes com massa, volume e soluções variados para se chegar a uma proporção pó/líquido que permitia a manipulação e modelação do material, partindo-se inicialmente por água deionizada como componente líquido. Foi observado que cada composição cerâmica exibia comportamentos distintos frente às soluções empregadas para manipulação das pastas.

Desta forma, cada cimento foi preparado com a solução que permitia a sua manipulação por pelo menos 2 minutos, sem precipitar antes disso, que formasse uma pasta e que não aumentasse a temperatura.

Em relação à composição dos cimentos CaS e CaSSi, partiram-se de sulfato de cálcio hemihidratado (ZP[®] 150, Z Corporation) que foi então misturado a água

deionizada para formar uma pasta homogênea e transferida para um molde cilíndrico para análise do tempo de cura.

No caso dos cimentos CaP e CaPSi, o objetivo foi preparar um cimento de DCPD partindo de β -TCP e MCPM (Synth), onde HA (Carlo Erba Group Reagents) foi mantida a 1.100°C por 4 horas para a obtenção do β -TCP, que foi passado numa peneira Retch com malha de 63 μ m. A proporção β -TCP/MCPM foi calculada para a conversão teórica de β -TCP de 67%, que possui características interessantes quanto cimento, baseado nos estudos de Boschi e Carrodegua (2002; Processo Fapesp 02/01745-5). Já os cimentos CaAl e CaAlSi foram preparados a partir do cimento de aluminato de cálcio Secar[®] 71 (Kerneos, França), um cimento considerado puro que permite a formulação de todos os tipos de concretos refratários e possui aproximadamente 70% de alumina, como apresentado no item 1.4. Pelo processo de sinterização ocorre a formação das fases CA e CA₂, com uma pequena quantidade de alumina remanescente.

Como o objetivo foi preparar pastas moldáveis e homogêneas, foram testadas várias soluções até que alcançasse o proposto. Todos os cimentos foram inicialmente misturados com água deionizada e observada a sua reação. No caso dos cimentos CaP e CaAl não foi possível trabalhar com água porque foi observado uma cura rápida com aumento de temperatura para o cimento CaP, e longo tempo para cura para o cimento CaAl. Assim, a alternativa foi buscar soluções que minimizassem estas características e foi determinado o PEG 400/H₂O (1:1) para os CaPs e dispersão aquosa de 1% em massa de CMC para os CaAls. O PEG foi selecionado porque possui característica não tóxica, é utilizado na área alimentícia e biomédica, na produção de medicamentos e alguns biomateriais (ZHANG, M. et al., 2002; GREENWALD, 2001).

Outro fato observado foi o aumento da razão L/P nos cimentos que possuem sílica mesoporosa em sua composição, quando comparado com os cimentos de base, que é provavelmente resultado da alta capacidade de absorção de água que essas partículas apresentam. Após a mistura do pó com o líquido do cimento, a sílica mesoporosa absorveu uma grande quantidade da parte líquida e isso pode resultar em uma hidratação não completa do cimento. Para evitar esse problema, a sílica mesoporosa pode ser saturada com água deionizada (VAN DEN VREKEN et al., 2012), previamente, ou aumentar o volume da solução utilizada. Porém, essa

opção pode levar ao aumento da porosidade final e, conseqüentemente, levar a redução das propriedades mecânicas.

Tempo, temperatura e pH de cura

A Tabela 10 apresenta os resultados de tempo final de cura obtidos pelos cimentos CaS, CaP e CaAl, sem e com sílica mesoporosa.

O tempo inicial de cura é determinado como o final da moldabilidade e o tempo final de cura é conhecido como o tempo onde se pode tocar o cimento sem causar danos graves (DRIESSENS; PLANELL; GIL, 1995).

Levando em consideração a aplicação clínica, materiais ósseos injetáveis devem ser aplicados antes de endurecerem e esse período não deve ser muito longo após a extrusão. De acordo com Driessens et al. (1997), o tempo de cura deve permitir a manipulação adequada do cimento, mas não pode ser muito extenso para a aplicação clínica, sendo o tempo de cura inicial e final próximos a 5 minutos e 20 minutos, respectivamente. Assim, a proporção L/P foi determinada para que o tempo de final cura (F-ST) fosse entre 20-30 minutos (Tabela 4), levando em consideração que os moldes foram imersos em SBF para simular a cura *in situ*.

Tabela 10. Tempo de final de cura dos cimentos.

Amostra	F-ST (min)
CaS	23
CaSSi	25
CaP	26
CaPSi	30
CaAl	25
CaAlSi	36

Fonte: Elaborado pela autora

A análise da temperatura de cura consistiu em medir o calor liberado pelo cimento durante a sua hidratação. Esse é um parâmetro importante em relação aos cimentos biológicos, pois alguns cimentos fazem com que elevadas temperaturas sejam atingidas dentro do organismo, podendo levar as células que estão em

contato com o cimento, à necrose durante a cura. O aumento da temperatura local pode gerar com o tempo uma cápsula fibrosa, e influenciar na produção de micro movimentos entre o cimento e o osso, resultando na soltura do implante quando o cimento é usado na interface implante-osso (DOHMAE et al., 1988; STRÖMBERG; HERBERTS; PALMERTZ, 1992).

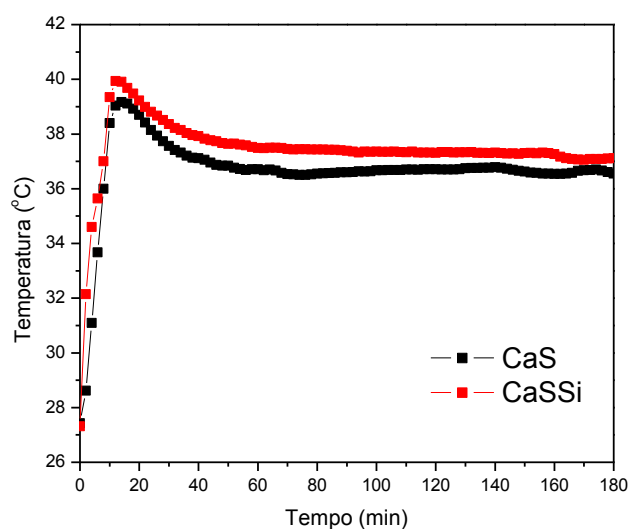
Os perfis da temperatura de cura em função do tempo para os cimentos em estudo são apresentados nas Figuras de 21 a 23.

O aumento da temperatura é típico da reação de hidratação e pode ser observado nos gráficos dos cimentos CaS, CaP e CaAl. Nos cimentos CaS e CaSSi, esse aumento ocorre próximo a 15 minutos com temperatura máxima em 40°C. No caso dos cimentos CaP e CaPSi a temperatura máxima é de 38°C em cerca de 10 minutos. Já para o cimento CaAlSi não foi observado esse aumento na temperatura até o final dos 180 minutos, embora no CaAl foi detectado em 50 minutos e não ultrapassou a temperatura de $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ fornecida durante o experimento. Resultados semelhantes aos CaAls foram observados por Oliveira, Pandolfelli e Jacobovitz (2010) quando estudaram a temperatura de cura dos cimentos endodônticos MTA (*Mineral Trioxide Aggregated*) e Secar[®] 71 sem aditivos, para uso como cimentos endodônticos.

Esses resultados representam uma importante informação sobre a cinética de reação, onde durante a hidratação da maioria das fases reativas, certa quantidade de calor é gerada, o que faz aumentar a temperatura de cura (ALT et al., 2003). Levando em consideração que in vivo o calor será dissipado pela umidade local, o risco de um dano ao tecido deve ser minimizado.

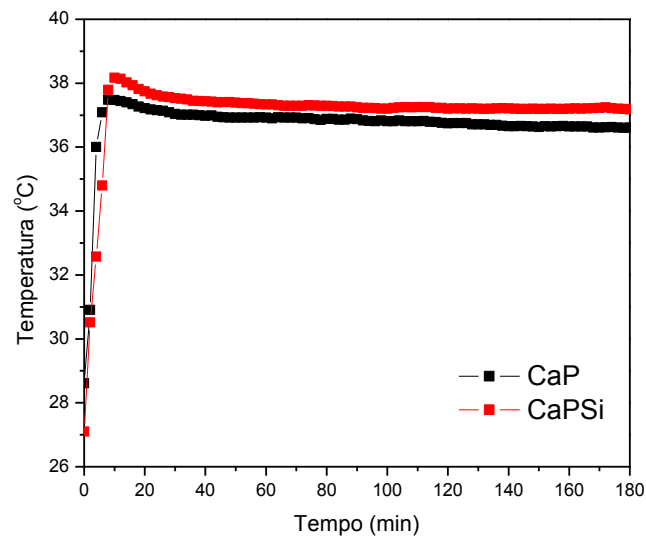
De acordo com a ASTM F451-12, normas para cimentos acrílicos para aplicação óssea, a máxima temperatura in vitro desses materiais é de aproximadamente 60-80°C, porém em estudos clínicos foi observado que esse valor foi reduzido para 40-47°C (KUEHN et al., 2005; MOREJÓN et al., 2005) devido à circulação sanguínea e dissipação de calor para o tecido circundante.

Figura 21. Perfis da temperatura de cura em função do tempo para os cimentos CaS e CaSSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.



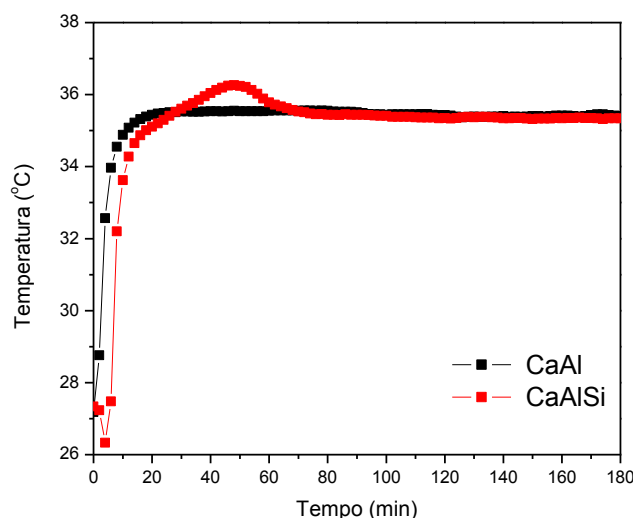
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 22. Perfis da temperatura de cura em função do tempo para os cimentos CaP e CaPSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 23. Perfis da temperatura de cura em função do tempo para os cimentos CaAl e CaAlSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora

Para as medidas do pH de cura em função do tempo, os cimentos com e sem sílica mesoporosa foram manipulados e colocados em um molde de cloreto de polivinila (*Polyvinyl chloride*, PVC). Logo após o preenchimento do molde, foram imersos em solução SBF a 37°C e pH 7,4, sendo esse momento considerado 0 minuto.

Os perfis referentes às variações do pH da solução SBF promovidos pelos cimentos estão apresentados nas Figuras de 24 a 26.

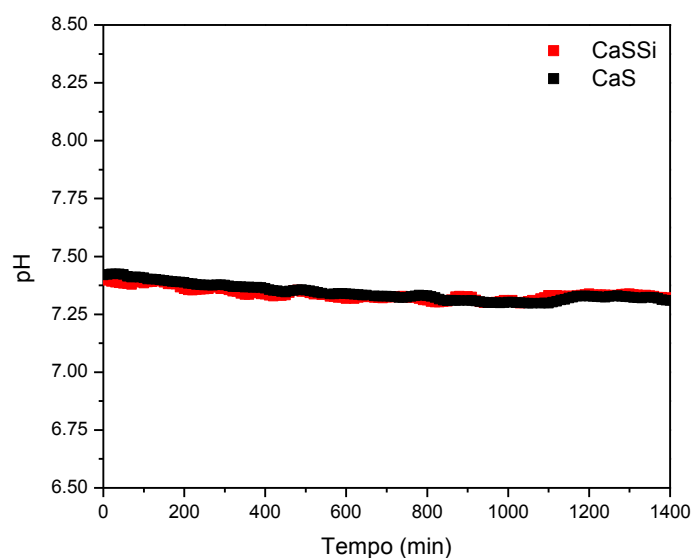
Os cimentos CaS e CaSSi apresentam perfis bem parecidos, com leve redução do pH inicial. Mesmo com esse comportamento, o pH da solução circundante permaneceu na neutralidade, onde os valores de pH estiveram próximos a 7,4 durante as primeiras 24 horas (Figura 24). Já foi observado que a dissolução do sulfato de cálcio hemihidratado e a formação de sulfato de cálcio dihidratado pode reduzir o pH do meio (THOMAS; PULEO, 2009), porém essa característica não foi observada durante o período analisado e utilizando a solução SBF.

Os cimentos CaP e CaPSi promoveram uma leve redução do pH da solução SBF. Pode-se notar que o cimento CaP, sem sílica, reduz o pH de forma mais rápida que o CaPSi (Figura 25). Os valores de pH alcançaram valores próximos a 6,9.

Os cimentos CaAl e CaAlSi não alteraram o pH da solução SBF e os valores permaneceram próximos a 7,5.

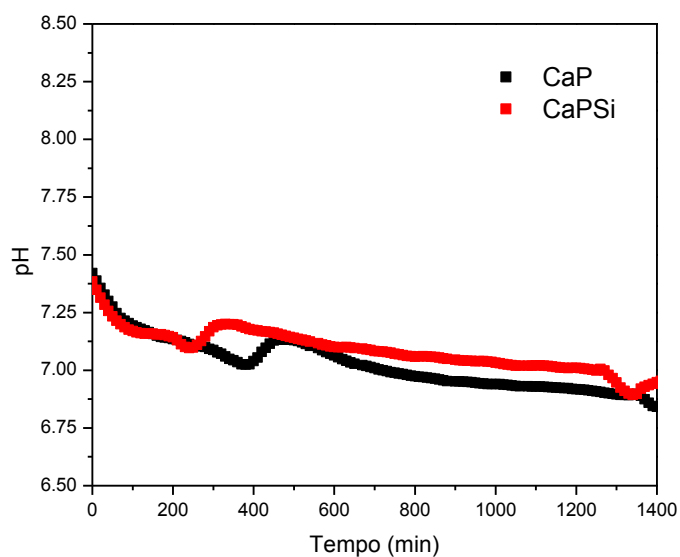
Mesmo após os seus respectivos tempos finais de cura, os cimentos estudados parecem não alterar de forma significativa o pH da solução tamponada de SBF a valores muito fora da neutralidade.

Figura 24. pH de cura em função do tempo em contato com solução SBF para os cimentos CaS e CaSSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.



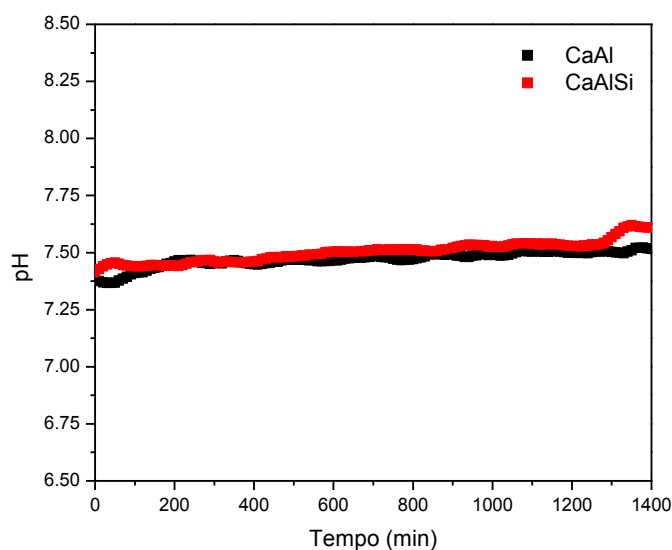
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 25. pH de cura em função do tempo em contato com solução SBF para os cimentos CaP e CaPSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 26. pH de cura em função do tempo em contato com solução SBF para os cimentos CaAl e CaAlSi, sem e com sílica mesoporosa, respectivamente.



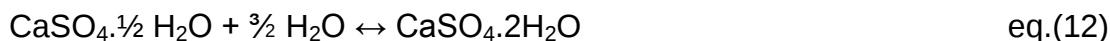
Fonte: Elaborado pela autora

Mesmo com tempos de cura distintos, todas as formulações estudadas possuem valores de pH compreendidos entre 6,5 e 8,5 durante as primeiras 24 horas, considerados como níveis aceitáveis para uso clínico (DRIESSENS et al., 1997).

Difração de Raios X

A difração de raios X foi utilizada para analisar as fases cristalinas presentes nos cimentos, resultante da sua respectiva hidratação após imersão em SBF por 24 horas. Os difratogramas estão apresentados nas Figuras de 27 a 30 e as difrações foram identificadas através da coleção de padrões de difração do ICDD, PDF-2 (*International Centre for Diffraction Data, Power Diffraction File-2*). O difratograma que corresponde ao sulfato de cálcio, usado para a preparação do cimento CaS e CaSSi, mostra que se trata de um sulfato de cálcio hemihidratado (Figura 27). As difrações correspondentes a essa fase cristalina estão em $14,6^\circ$, $25,6^\circ$, $31,9^\circ$ 2θ , com uma difração máxima em $29,7^\circ$ 2θ (JCPDS #01-33-310). Com a mistura do componente líquido do cimento e 24 horas em imersão em solução SBF, houve a hidratação do sulfato de cálcio hemihidratado formando sulfato de cálcio dihidratado

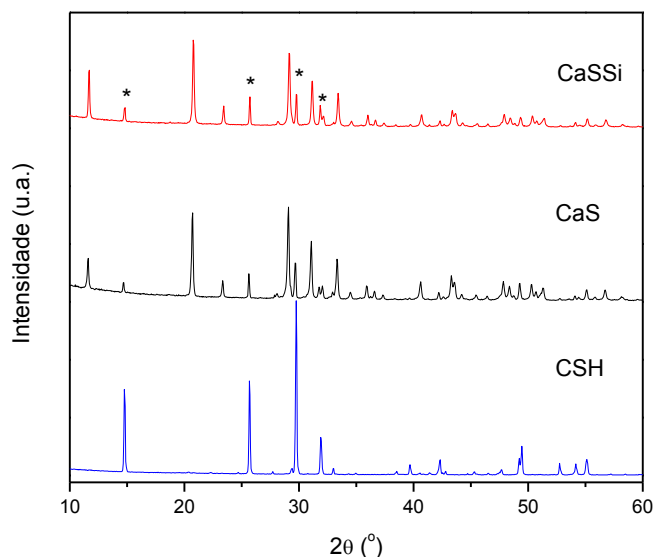
nos cimentos CaS e CaSSi, de acordo com a equação (12) (THOMAS; PULEO, 2009).



Pode-se observar que o difratograma do cimento sem sílica mesoporosa apresenta difrações em $11,5^\circ$, $20,6^\circ$, $29,7^\circ$, $31,0^\circ$ e $33,2^\circ$ 2θ , correspondendo a sulfato de cálcio dihidratado (JCPDS #01-36-432).

Quando se analisa o difratograma desses cimentos, observa-se as difrações correspondentes ao sulfato de cálcio dihidratado e também difrações características do material inicial, sulfato de cálcio hemihidratado. Isso mostra que a hidratação não foi completa, ou seja, que é preciso um período maior que 24 horas para a conversão total para sulfato de cálcio dihidratado.

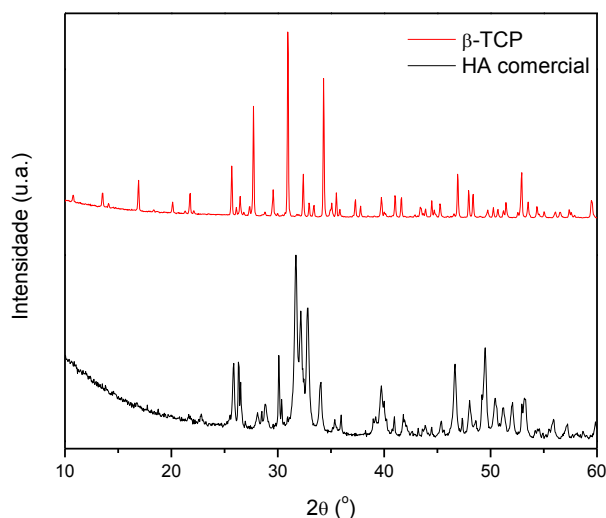
Figura 27. Difratogramas de raios X para os cimentos CaS e CaSSi; as difrações referentes a sulfato de cálcio hemihidratado estão assinaladas por (*).



Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 28 apresenta os difratogramas dos pós de HA comercial antes e depois do tratamento térmico. Analisando os difratogramas, pode-se observar que o tratamento térmico à temperatura de 1100°C foi eficiente para a conversão de HA em β -TCP, confirmado pelo JCPDS número 00-009-0169.

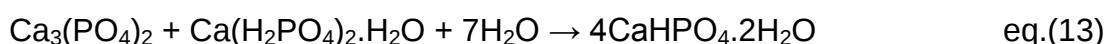
Figura 28. Difratomogramas de raios X de HA em pó antes e após tratamento térmico por 1100°C.



Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 29 apresenta os difratogramas de raios X dos cimentos CaP e CaPSi comparando com o pó de β -TCP inicial.

Quando β -TCP e MCPM são misturados na presença de água, eles reagem e formam um produto conhecido como bruxita (DPCD), de acordo com a reação na equação 13 (MIRTCHI; LEMAITRE; TERAQ, 1989; CHARRIERE et al., 2001).

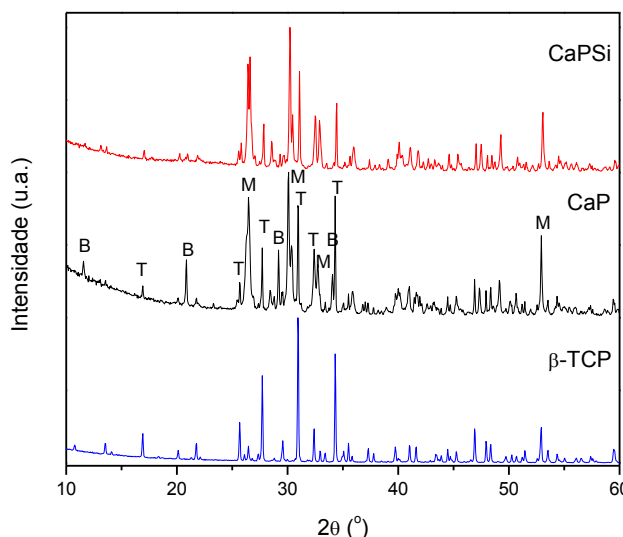


O que se espera quando ocorre a mistura entre β -TCP e MCPM com excesso de β -TCP, é que o principal produto de hidratação seja a bruxita, com uma fração de β -TCP não reagido e também uma fase de bruxita não hidratada, conhecida como monetita (DCPA , CaHPO_4).

A cura do cimento CaP resultou em uma mistura de monetita com difrações em 26,5°, 30,1° e 32,8° 2θ (JCPDS # 00-009-0080) e β -TCP (JCPDS # 00-009-0169) em maior proporção. Pode-se observar difrações em 11,5°, 20,8° e 29,4° 2θ referente a uma fase minoritária de bruxita (JCPDS # 00-009-0077). Entretanto, quando se analisa o difratograma do cimento CaPSi, as difrações referentes a bruxita não são observadas e o principal produto da hidratação é a monetita com uma grande fração de β -TCP não reagido. De acordo com esses resultados, pode-

se confirmar que 24 horas não são suficientes para total hidratação dos cimentos, principalmente para o CaPSi, onde a presença da sílica pode ter retardado a hidratação (HUAN; CHANG, 2009).

Figura 29. Difratogramas de raios X do pó de β -TCP precursor e dos cimentos CaP e CaPSi após 24 horas em SBF; B=Bruxita, M=Monetita, T= β -TCP.



Fonte: Elaborado pela autora

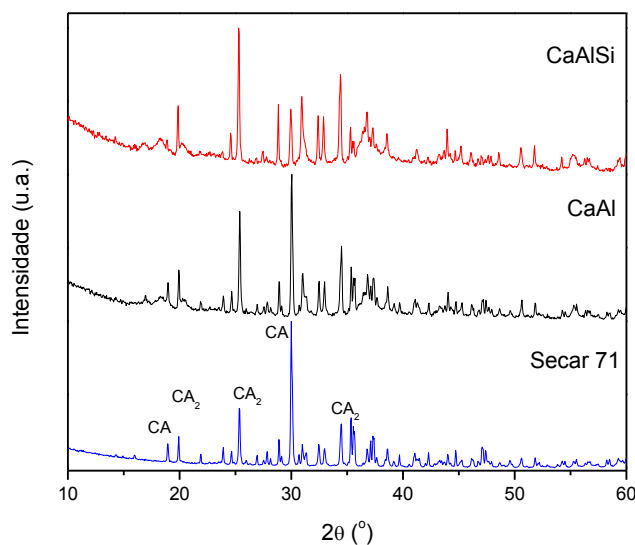
Os resultados de difração de raios X obtidos para os cimentos CaAl e CaAlSi, preparados a partir do Secar 71™ são apresentados na Figura 30. Foi observado a presença da fase monoclinica (CaAl_2O_4 , CA) como fase principal, $18,8^\circ$ e $30,0^\circ$ 2θ (JCPDS #00-070-0134), porém com adição de sílica mesoporosa essa fase cristalina se tornou secundária no CaAlSi. Nota-se também a presença da fase de aluminato de dicálcico (CaAl_4O_7 , CA_2) como fase secundária no cimento CaAl, com difrações em aproximadamente $19,8^\circ$, $25,3^\circ$ e $34,3^\circ$ 2θ (JCPDS #00-023-1037).

Logo, a fase CA_2 requer um longo período de tempo para se hidratar e sua presença acelera o processo de hidratação da fase CA.

A fase CA promove resistência ao material durante a sua hidratação e apresenta um rápido endurecimento após o início da cura. Já a fase CA_2 é mais refratária e sua presença pode acelerar o processo de cura da fase CA, entretanto o efeito oposto não é observado (LEE, W. E. et al., 2001; ANDRADE et al., 2014).

Enquanto o cimento CaAl após a cura apresenta as mesmas fases cristalinas que o material precursor, a predominância da fase CA_2 no cimento com sílica, sugere que este cimento necessita de um tempo maior para a hidratação, como mostrado nos resultados de tempo de cura.

Figura 30. Difratogramas de raios X do pó do cimento aluminato de cálcio Secar 71 e dos cimentos CaAl e CaAlSi após 24 horas em SBF; $CA=CaAl_2O_4$, $CA_2=CaAl_4O_7$.



Fonte: Elaborado pela autora

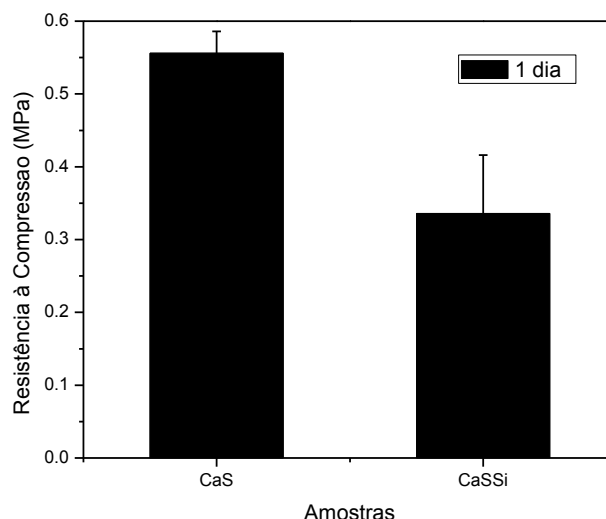
Medidas de Resistência à Compressão

A propriedade mecânica é um importante fator a ser considerado para aplicações clínicas de materiais para a reparação óssea. Medidas de resistência à compressão foram realizadas com todos os cimentos e os resultados estão apresentados nas Figuras de 31 a 33.

As medidas de resistência à compressão dos cimentos CaS e CaSSi foram realizadas após 24 horas de cura em imersão em solução SBF a 37°C (Figura 40). Os resultados mostram que os valores da resistência à compressão desses cimentos foram 0,53MPa para CaS e 0,39MPa para CaSSi. Deve-se destacar a influência da presença das partículas de sílica mesoporosa nessa propriedade, pois devido à sua presença no componente sólido, houve aumento na proporção L/P, contribuindo com a porosidade do produto final e, conseqüentemente, reduzindo sua resistência mecânica. Os resultados desses cimentos após 7 dias de imersão em

solução SBF não puderam ser obtidos, uma vez que os corpos de prova se desconfiguraram durante o ensaio e não houve ruptura dos corpos de prova, o que sugere que esses cimentos não possuem resistência à compressão após esse período em imersão.

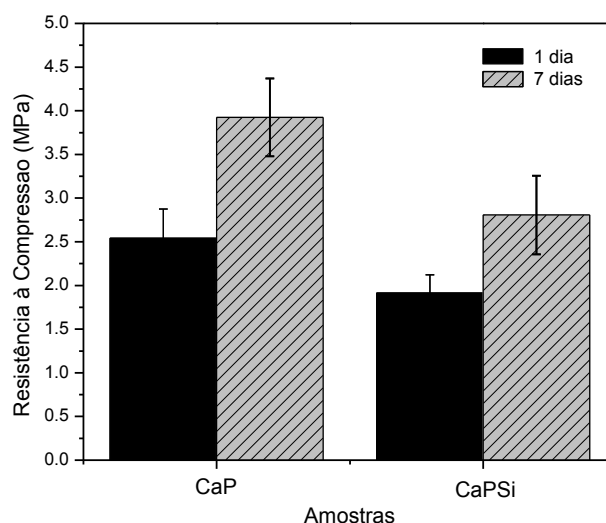
Figura 31. Resistência à compressão dos cimentos CaS e CaSSi após 24 horas de cura em imersão.



Fonte: Elaborado pela autora

No caso dos cimentos CaP e CaPSi, as medidas de resistência à compressão foram realizadas após 24 horas e 7 dias de cura em imersão em solução SBF a 37°C, levando em consideração que a formulação estudada não se configura fora de uma solução aquosa, sendo que o mecanismo de hidratação foi apresentado nos resultados de difração de raios X. A Figura 32 apresenta os valores obtidos pelos cimentos CaPs. É interessante observar que a resistência à compressão desses materiais aumenta com o aumento do tempo de imersão. Após 24 horas em imersão, o cimento CaP obteve 2,54MPa e o CaPSi, 1,95MPa, mas após 7 dias em solução SBF esses valores passaram a 3,95MPa e 2,81MPa, respectivamente. Esses resultados podem confirmar a contínua difusão do meio aquoso pelo interior do material, resultando no aumento da precipitação de cristais de bruxita, monetita ou mesmo hidroxiapatita. Além disso, as imagens de SEM após 24 horas em solução SBF mostraram que os cimentos apresentavam muitas partículas de β -TCP que ainda não haviam reagido devido à falta de contato com moléculas de água.

Figura 32. Resistência à compressão dos cimentos CaP e CaPSi após 1 dia e 7 dias de cura imersos em solução SBF.

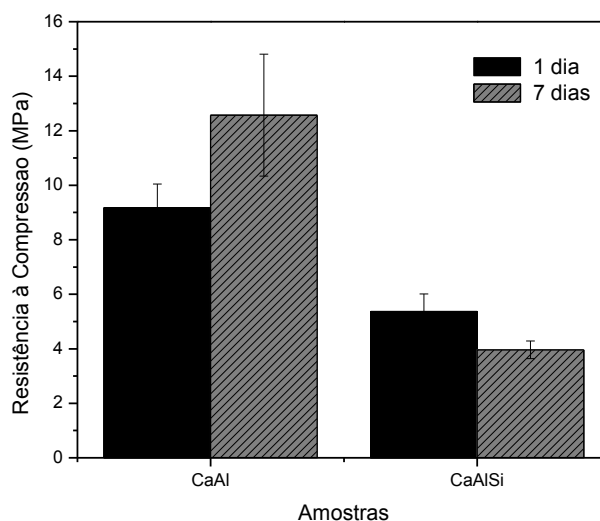


Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 33 apresenta os resultados das medidas de resistência à compressão dos cimentos CaAl e CaAlSi, após 1 e 7 dias de cura imersos em solução de SBF. O aumento da resistência mecânica com o aumento do tempo de imersão também foi observado pelo cimento CaAl. O valor da resistência desse cimentos passou de 9,2MPa após 1 dia de imersão em solução SBF, para 12,6MPa após 7 dias. Sabe-se que quando um cimento de aluminato de cálcio é misturado à água, os minerais hidráulicos se dissolvem, formando uma solução saturada de íons Ca^{2+} e OH^- . A nucleação dos produtos de hidratação e seus subsequentes cristais produz uma rede interligada que confere a cura e a resistência do cimento.

Nessa formulação também foi observada a interferência da sílica mesoporosa nas características físico-químicas do cimento. O cimento CaAlSi mostrou resistência em 5,39MPa após 1 dia em solução SBF, quase metade do valor obtido pelo cimento sem sílica, porém esse valor reduziu para aproximadamente 4,0MPa após 7 dias.

Figura 33. Resistência à compressão dos cimentos CaAl e CaAlSi após 1 dia e 7 dias de cura imersos em solução SBF.



Fonte: Elaborado pela autora

Um parâmetro muito importante das pastas cimentícias é a proporção L/P. A partir dela é que se definem as características físico-químicas que o produto irá apresentar. Sabe-se que quanto maior essa proporção, maior a porosidade do cimento e, conseqüentemente, menor a resistência mecânica. As formulações com sílica mesoporosa necessitaram de uma quantidade maior do líquido de mistura para que formasse uma pasta moldável, desta forma, um menor valor para a resistência mecânica já era esperado. Outra característica das partículas de sílica mesoporosa que podem ter interferido é a sua fácil hidratação em relação aos pós cerâmicos e isso também refletiu na hidratação dos cimentos.

É conhecido que os materiais cerâmicos utilizados em aplicações clínicas possuem baixa resistência mecânica em relação ao osso cortical, que é um fator limitante nas suas possibilidades de uso, restringindo a locais com menores cargas físicas. A resistência à compressão dos ossos varia, dependendo da sua densidade, desde 130 à 180 MPa para osso cortical e de 5 à 50MPa para o osso trabecular (MANSOS, 2008).

Desta forma, a busca por materiais com melhores propriedades mecânicas tem sido proposta para a aplicação óssea, pois nos melhores casos alcançam valores do osso trabecular. Uma das possibilidades para melhorar essa propriedade seria a adição de polímeros. A mistura de policaprolactona ou ácido polilático ao β -TCP em pó, na obtenção de *scaffolds*, resultou em valores próximos a

100MPa (MARTINEZ-VASQUEZ et al., 2011). El-Maghraby e colaboradores (2010) obtiveram um cimento de sulfato de cálcio com resistência mecânica 18,2MPa após 7 dias de cura a 37°C em estufa, porém esse valor foi próximo a 28MPa quando o pó cerâmico foi pré-misturado com 1%(m/m) de álcool poli-vinílico. Comparando esses valores com os resultados obtidos nesse trabalho para o mesmo material (CaS, 0,55MPa), pode-se observar que a metodologia empregada nesse teste pode interferir nos resultados, ou seja, o ambiente onde o cimento passa pelo processo de hidratação resulta em maior ou menor resistência mecânica. Nesse trabalho, optou-se pela mensuração após imersão por ser mais coerente quando se pretende obter um cimento injetável.

Em relação aos cimentos CaPs e CaAl, os resultados mostraram que houve aumento na resistência à compressão com o aumento do tempo de imersão. Esse resultados sugere que esse cimentos não atingiram o máximo de hidratação em 24 horas, mesmo com tempos cura final próximo a 30 minutos.

Assim os resultados sobre a resistência à compressão dos cimentos foram:

CaAl > CaAlSi > CaP > CaPSi > CaS > CaSSi (1 dia de imersão)

CaAl > CaAlSi = CaP > CaPSi (7 dias de imersão)

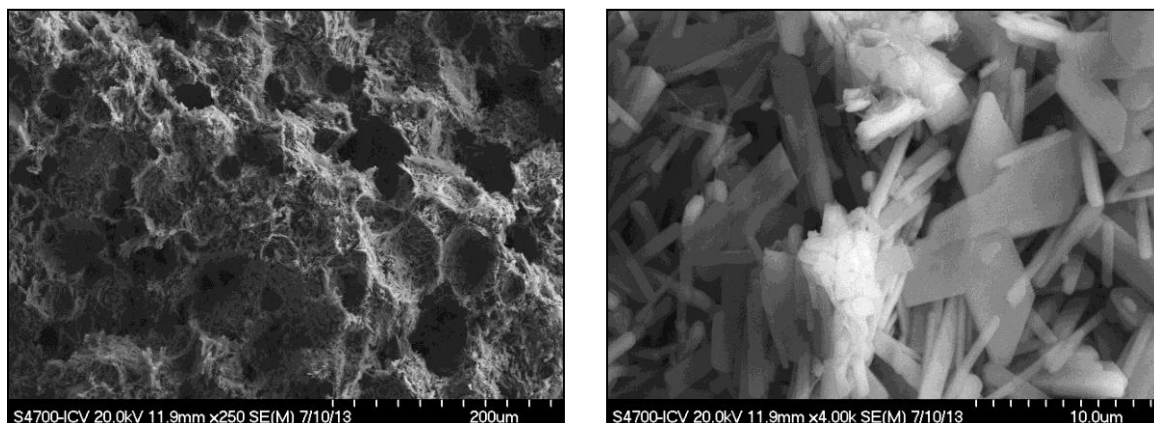
Microscopia Eletrônica de Varredura

As Figuras de 34 a 39 apresentam as imagens obtidas através da superfície da fratura dos cimentos que permaneceram em imersão por 24 horas em SBF, após as medidas de resistência à compressão dos corpos de prova dos cimentos.

As imagens relativas aos cimentos CaS e CaSSi (Figuras 34 e 35, respectivamente) mostram que, ambos materiais, possuem estrutura interna bastante porosa. É possível observar cristais em formato de bastonete, que pode ser atribuído ao sulfato de cálcio hemihidratado, material inicial. Através dos resultados de raios X, observou-se que o material de base desses cimentos, sulfato de cálcio hemihidratado, após a hidratação do cimento, formou outra fase cristalina, o sulfato de cálcio dihidratado. Assim, as imagens de microscopia eletrônica de varredura comprovam a presença de estruturas cristalinas em forma de folhas que correspondem a cristais de sulfato de cálcio dihidratado no cimento CaS (CHEN, Z.

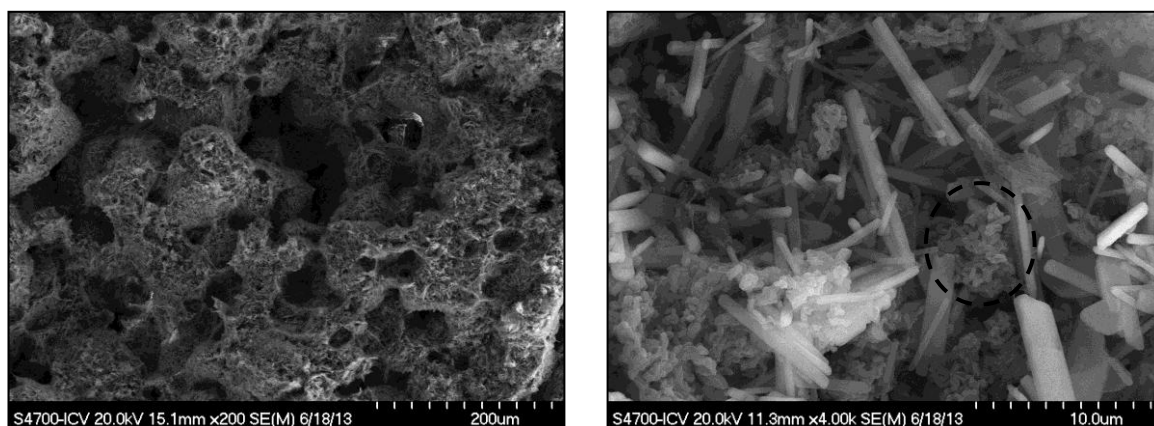
et al., 2011). Já no cimento CaSSi essas duas fases cristalinas estão bem visíveis e ainda pode-se notar a distribuição das partículas de sílica mesoporosa entre os cristais de sulfato de cálcio.

Figura 34. Imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaS.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 35. Imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaSSi e a presença de partículas de sílica mesoporosa entre os cristais (em destaque).



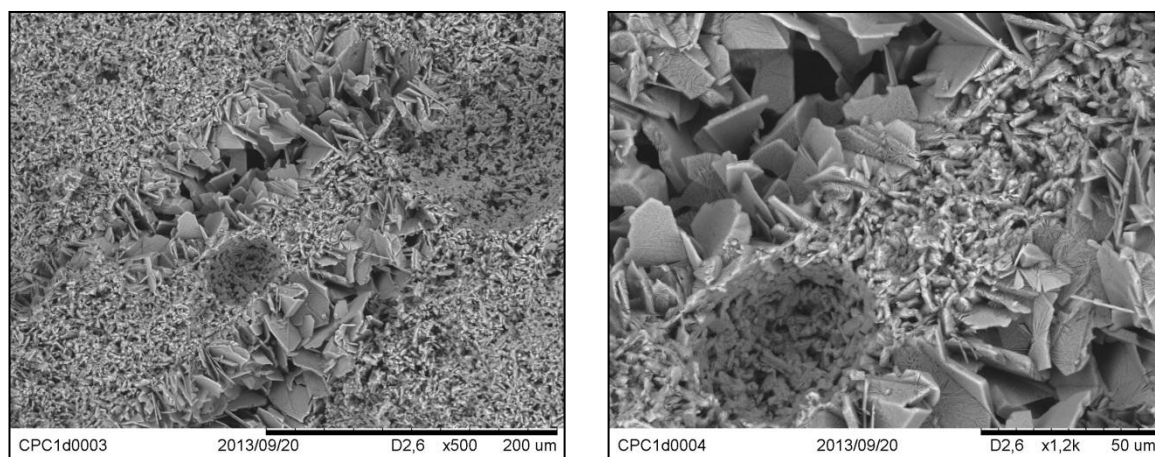
Fonte: Elaborado pela autora

As Figuras 36 e 37 apresentam as imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura dos cimentos CaP e CaPSi, respectivamente. As imagens mostram que ambos os cimentos possuem distintas fases cristalinas, com destaque de grandes cristais em forma de placas, e partículas menores que podem ser atribuídas ao β -TCP que não reagiu, levando em consideração a conversão teórica para DCPD de 67%.

Essa característica também pode estar relacionada ao uso do PEG como um dos componentes líquidos para obtenção das pastas de fosfato de cálcio. Quando cimentos a base de β -TCP e MCPM são misturados com água para obtenção de uma pasta, em razão L/P adequada, a cura resulta em uma única morfologia cristalina característica de cristais de DCPD (HAN et al., 2009). A cura dos cimentos CaP e CaPSi depende da troca entre a solução não aquosa, no caso o PEG, e a solução aquosa do meio de imersão. Como um material viscoso, o PEG pode melhorar a coesão e a propriedade reológica dos cimentos de fosfato de cálcio, mas ao mesmo tempo impede a reação de cura porque envolve as partículas sólidas do cimento (HAN et al., 2009). Notou-se que essa troca foi relativamente lenta e formou dois compostos cristalinos, monetita e bruxita, e a permanência de partículas do material sólido precursor, β -TCP, como confirmado por difração de raios X.

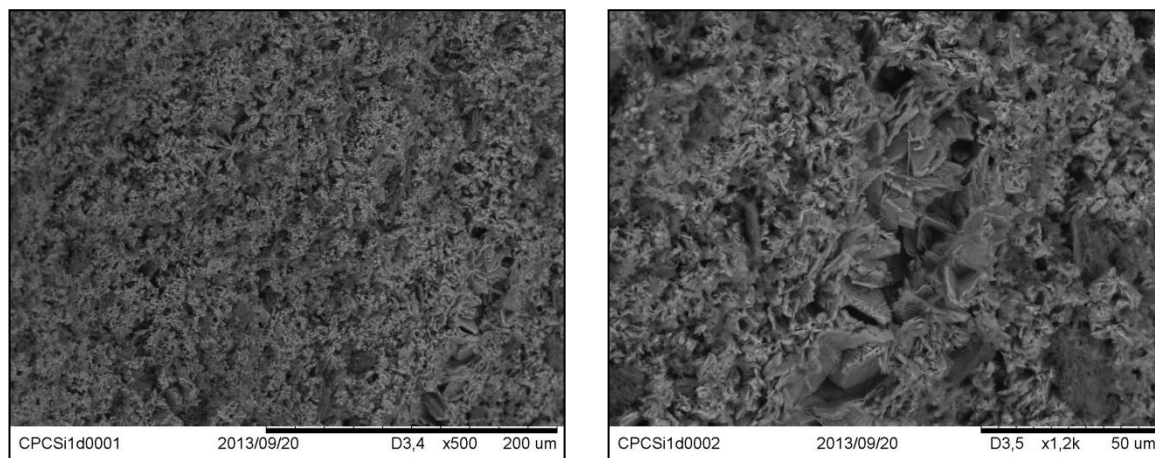
Assim, a presença do PEG resultou em contato insuficiente e, conseqüentemente, interferiu na reação da água com as partículas dentro do cimento, levando em consideração o tempo de cura, onde a porção mais exterior da amostra parece ter endurecido rapidamente em ambos os cimentos CaPs.

Figura 36. Imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaP.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 37. Imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaPSi.



Fonte: Elaborado pela autora

As imagens referentes à superfície de fratura dos cimentos CaAl e CaAlSi estão apresentadas nas Figuras 38 e 39, respectivamente. Analisando as imagens, pode-se observar que a estrutura interna de ambos os cimentos não é homogênea, apresentando estruturas com morfologias distintas, e a superfície se mostra fragmentada com canais cristalinos. Esses canais cristalinos devem estar sendo formados pelo contato com a água que está difundindo do meio de imersão para o interior do cimento, promovendo, assim, a reação de hidrólise e atuando como um ácido fraco sobre o material sólido básico (MAIER et al., 2010).

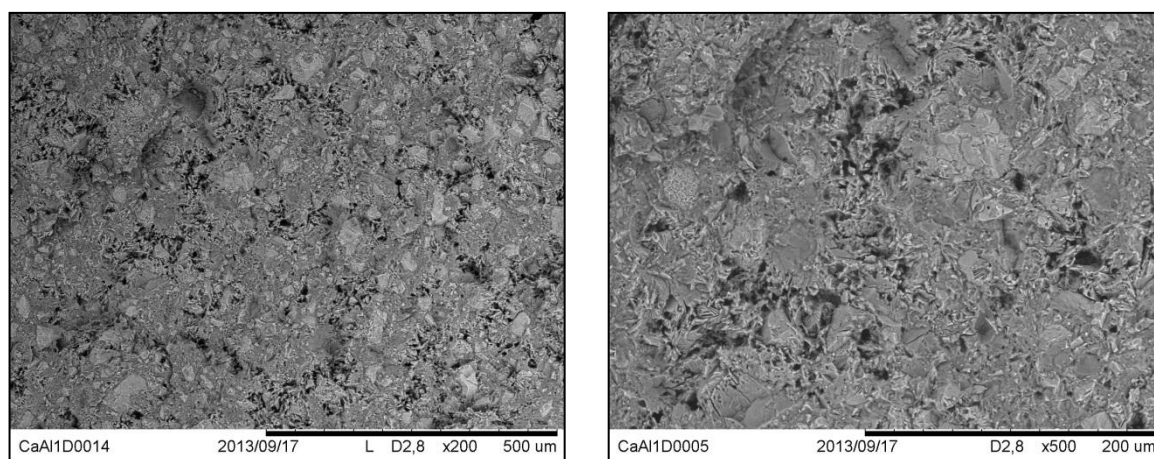
Os índices de hidratação estão fortemente relacionados à razão Ca/Al inicial e à temperatura. A hidratação da fase CA ocorre inicialmente através da dissolução e subsequente precipitação de CAH_{10} e C_2AH_8 , com reação final de acordo com a equação 14 (LEA, 1970).



Uma maior velocidade de hidratação origina um maior efeito do calor de hidratação, porém a fase CA_2 requer um longo período de tempo para se hidratar. Isso pode explicar o pequeno aumento na temperatura de cura desses cimentos. Dependendo da cristalinidade inicial do aluminato, a fase CAH_{10} pode ser detectado entre 6-24 horas após a mistura e a fase C_2AH_8 após 24 horas (LEE, W. E. et al., 2001). Em relação ao cimento CaAlSi, a hidratação pode estar ocorrendo de forma

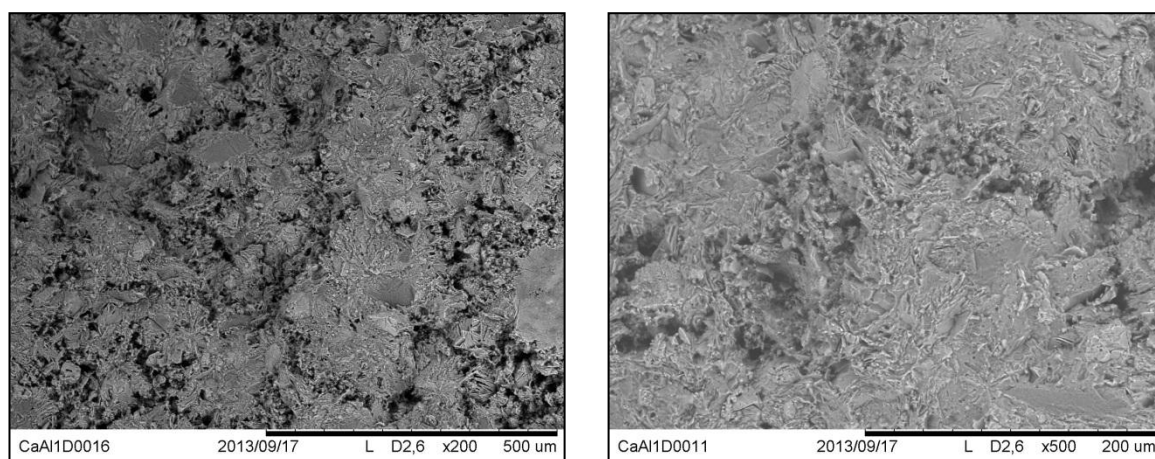
mais lenta do que aquele sem sílica mesoporosa, devido à facilidade da sílica em se hidratar, o que pode estar impedindo a formação dos produtos de hidratação no período analisado, assim como a predominância da fase CA_2 mostrado pelo difratograma correspondente a esse cimento.

Figura 38. Imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaAl.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 39. Imagem fornecida por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura do cimento CaAlSi.



Fonte: Elaborado pela autora

Densidade e Porosidade Aparente

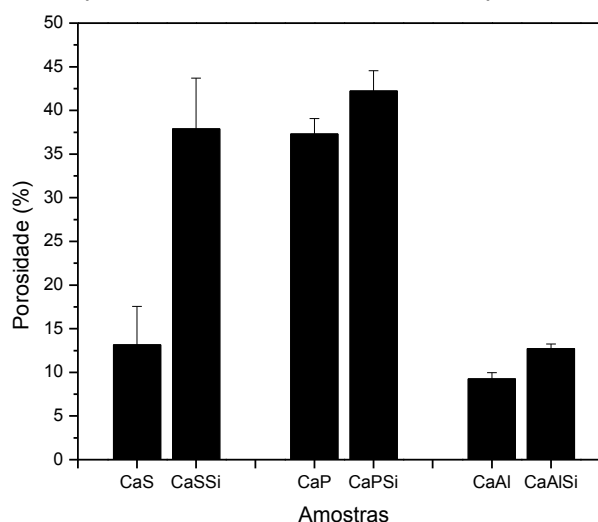
Os valores médios referentes à porosidade e a densidade aparente para os cimentos estudados estão apresentados nas Figura 40 e 41, respectivamente.

Através dos resultados apresentados na Figura 40, pode-se observar que todas as formulações apresentam valores de porosidade acima de 10%. Outra característica é que aqueles cimentos que possuem sílica mesoporosa em sua composição apresentaram maior porosidade quando comparadas com as formulações sem essas partículas.

Dentre os cimentos, os que apresentaram menor porosidade foram os CaAls, onde o CaAl apresentou $9,26 \pm 0,7\%$ de porosidade e o CaAlSi, $12,7 \pm 0,5\%$. Já os que mostraram maior porosidade foram o CaSSi, CaP e CaPSi, com $37,9 \pm 5,8$, $37,3 \pm 1,7$ e $42,2 \pm 2,3\%$, respectivamente.

No caso dos cimentos CaPs, que possuem β -TCP adicional nas suas formulações, determinadas quantidades remanescentes desse reagente podem ter um efeito negativo sobre as propriedades mecânicas, devido aos poros existentes entre os grãos. Além disso, pode não haver fases cristalinas suficientes para unir os grãos do cimento após o endurecimento (BARRALET; GROVER; GBURECK, 2004) devido também à presença de PEG e de sílica entre as partículas dos cimentos, levando ao aumento da porosidade do produto final e, desta forma, reduzindo a resistência mecânica.

Figura 40. Porosidade aparente dos cimentos com e sem partículas de sílica mesoporosa.

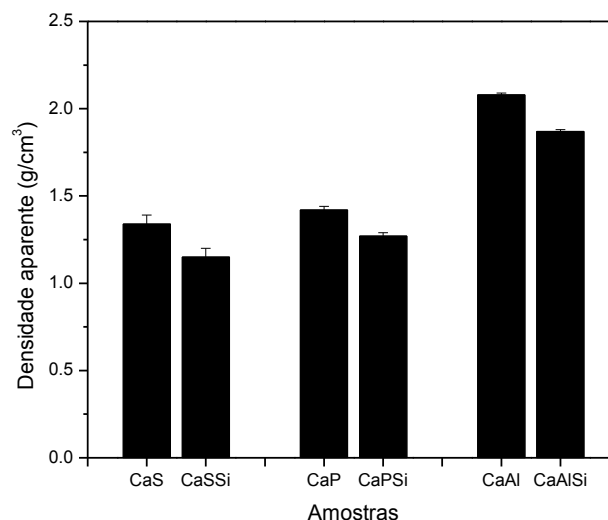


Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 41 apresenta os valores de densidade aparente para os cimentos CaSs, CaPs e CaAls. Os resultados mostram a redução da densidade aparente dos corpos de prova com a adição de sílica mesoporosa na composição dos cimentos,

em relação aqueles sem sílica. Além do mais, há uma relação inversa entre a densidade e a porosidade, onde os cimentos CaAls, que possuem menor porosidade, apresentaram maiores valores de densidade.

Figura 41. Densidade aparente dos cimentos com e sem partículas de sílica mesoporosa.



Fonte: Elaborado pela autora

A razão L/P é um fator que influencia na porosidade dos materiais cimentícios, onde quanto maior essa razão, maior a porosidade do material (ENGSTRAND; PERSSON; ENGQVIST, 2014). Sabe-se que a resistência mecânica é inversamente proporcional à porosidade do corpo cerâmico, porque é uma propriedade dependente da porção sólida do material, assim os vazios tendem a influenciar negativamente na resistência mecânica (HOFMANN, M. P. et al., 2009). Embora um procedimento para reduzir a porosidade seja a diminuição da relação L/P utilizada, a necessidade de se obter uma pasta moldável e injetável determina um limite nessa redução, além de refletir no tempo de cura.

De fato foi observado que com a pré-mistura das partículas de sílica mesoporosa nos componentes sólidos dos cimentos houve aumento da relação L/P para se obter uma pasta moldável similar às mesmas sem essas partículas. Devido a isso, tais cimentos apresentaram maior porosidade e menores valores de resistência mecânica.

Normalmente, após o tempo final de cura, cristais precipitam e crescem apitaxialmente, sendo os responsáveis pela aderência e intercruzamento das partículas dos cimentos. Com o tempo, devido ao processo de hidratação, uma

maior quantidade de cristais preenchem os vazios que podem ser compactos em algumas áreas de alta densidade e mais separados em áreas com maior porosidade (AMBARD; MEUNINGHOFF, 2006). As imagens de microscopia eletrônica de varredura das fraturas dos cimentos apresentaram canais porosos próximos às aglomerações das partículas de sílica, sugerindo que o aumento da porosidade pode ser também devido à dispersão das partículas dos cimentos promovida pelas partículas de sílica.

Por outro lado, a porosidade aberta é um fator favorável a osteocondução, que dependendo da dimensão, permite o crescimento de osso novo no interior dos poros do material (MACHADO; SANTOS, 2009). Pode-se dizer que os cimentos estudados possuem a tendência de favorecer esse comportamento, principalmente os que apresentam maiores porcentagens de porosidade. No entanto, esse valor não é estável, podendo ser alterado com o aumento do tempo de imersão e interação dos cimentos com a solução, como por exemplo, aumento da porosidade devido à degradação do material e/ou precipitação de HA sobre sua superfície, se caso for bioativo.

Injetabilidade

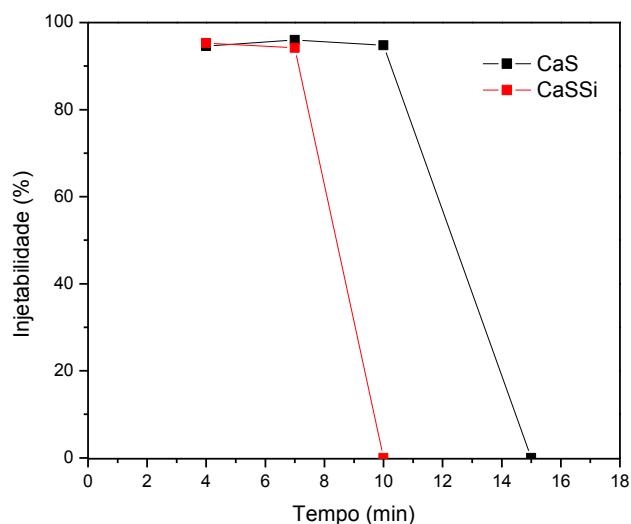
Para avaliar a importância do tempo de trabalho prático na injetabilidade dos cimentos, efetuou-se injeções mecânicas dos cimentos utilizando as mesmas razões L/P dos testes anteriores. As Figuras de 42 a 44 apresentam os resultados obtidos para os cimentos CaS, CaP e CaAl, respectivamente, sem e com partículas de sílica.

A partir da análise dos gráficos, pode-se observar que os cimentos CaSs apresentaram os menores tempos de injetabilidade que os demais materiais testados, ou seja, possuiu um menor tempo para manipulação do cimento e injeção na fratura. Além disso, o cimento CaSSi mostrou nenhuma injetabilidade em apenas 10 minutos após a mistura do pó com o líquido, sendo o tempo de trabalho mais curto apresentado.

Em relação aos cimentos CaP e CaPSi, nota-se que a presença de sílica mesoporosa interfere no tempo de trabalho desses cimentos. Os resultados demonstraram que 15 minutos após a mescla o CaPSi apresenta praticamente 0% de

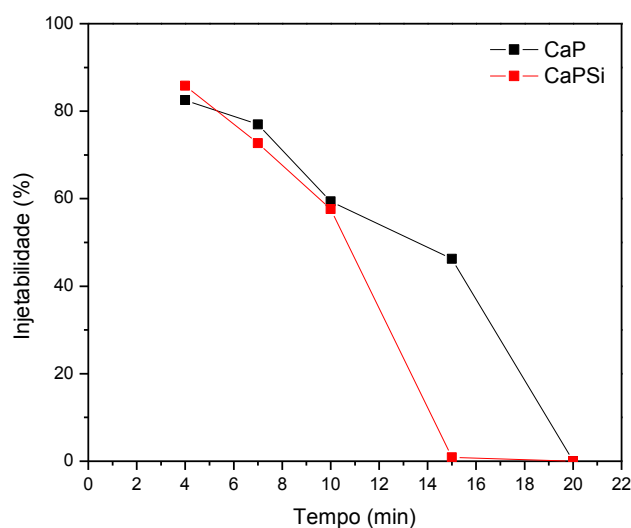
pasta injetada, enquanto o CaP ainda apresenta cerca de 50% de material extrudado.

Figura 42. Injetabilidade dos cimentos CaS e CaSSi em função do tempo após o início da mistura.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 43. Injetabilidade dos cimentos CaP e CaPSi em função do tempo após o início da mistura.

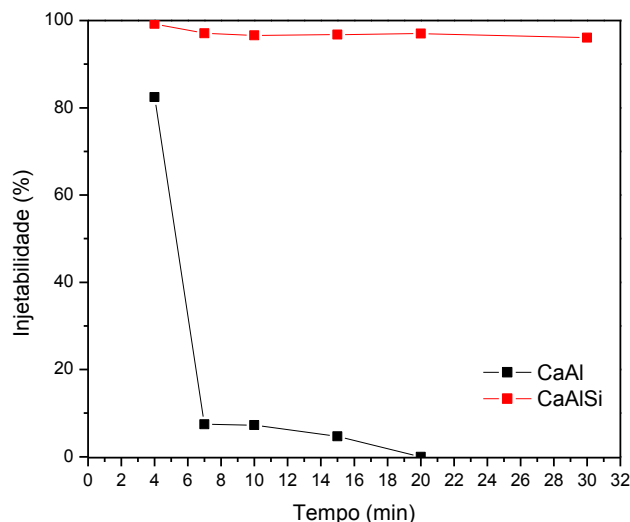


Fonte: Elaborado pela autora

Porém em relação ao cimento CaAlSi, a presença de partículas de sílica mesoporosa em sua composição atuou de forma positiva. O gráfico da Figura 44 mostra que mesmo após 20 minutos de mistura entre o pó e o líquido, no caso a dispersão aquosa de 1%*m* CMC, o comportamento de injetabilidade desse cimento

se manteve elevado, próximo a 95%. No entanto o cimento sem sílica, o CaAl, apresentou 0% de extrusão em 20 minutos após a mistura.

Figura 44. Injetabilidade dos cimentos CaAl e CaAlSi em função do tempo após o início da mistura.



Fonte: Elaborado pela autora

A ideia de injetabilidade de uma pasta é importante quando envolve defeitos ósseos de acessibilidade limitada ou quando se pretende usar técnicas cirúrgicas minimamente invasivas.

De acordo com Khairoun e colaboradores (1998), uma má injetabilidade se caracteriza pela ocorrência de separação de fase entre o componente sólido e o componente líquido, resultando em uma extrusão parcial. Mesmo com tempos de injetabilidade distintos, esse comportamento não foi observado em nenhum dos cimentos analisados, utilizando a carga máxima para injeção de 100N. De acordo com os mesmos autores, quanto maior for a quantidade de cimento extrudado da seringa, mais injetável ele é. Os resultados mostraram que os cimentos menos injetáveis são os CaS e CaSSi, que pode estar relacionado ao período necessário para a cura dos mesmos.

No entanto, o uso de uma mesma força pode ser questionável, pois a força necessária para extrudar uma pasta da seringa pode alcançar valores superiores a 100N. Assim, para alguns autores, o uso de uma força máxima pode não medir a injetabilidade, mas sim a facilidade de injeção de uma pasta (BOHNER; BAROUD, 2005; BURGUERA; XU; SUN, 2008), que está diretamente relacionada à sua

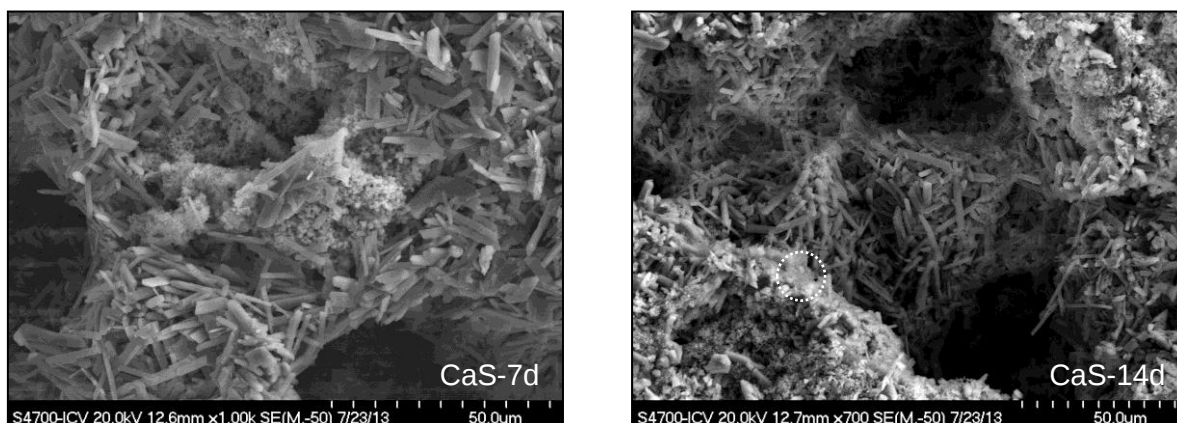
viscosidade, para que um cimento seja injetável a pasta deve apresentar baixa viscosidade, de modo a oferecer pouca resistência ao sair da seringa. Desta forma, os cimentos CaP e CaAl, de acordo com a metodologia utilizada, possuem maior facilidade de extrusão, em comparação aos cimentos CaS usando água deionizada como componente líquido.

Bioatividade e Degradação in vitro em solução SBF

Para determinar a bioatividade dos cimentos, moldes em forma de disco foram feitos e imersos em solução SBF por 7 e 14 dias. As imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos discos após a imersão em solução SBF estão apresentadas nas Figuras de 45 a 56.

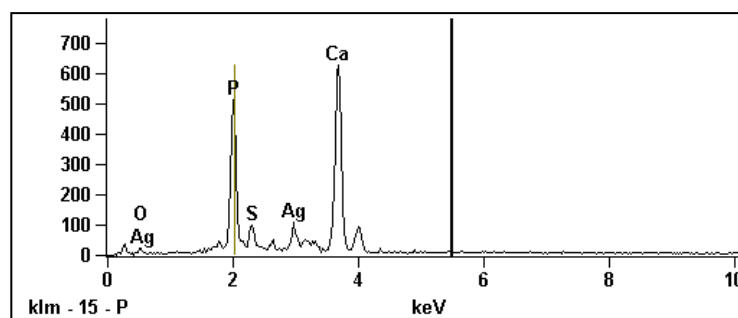
Pode-se observar que após a imersão em solução SBF por 7 dias, o cimentos CaS e CaSSi mostram precipitações em sua superfície, porém de forma não homogênea, intercalando com os cristais de sulfato de cálcio dihidratado e partículas de sílica (Figura 45 e 47). As imagens de 14 dias de imersão também apresentam essas estruturas precipitadas na superfície, que foram caracterizadas por EDS como sendo cristais de fosfato de cálcio (Figura 46 e 48), porém não se conseguiu mensurar se houve aumento ou não, embora as imagens de 14 dias de imersão em solução SBF mostrem que a precipitação foi maior para o cimento com sílica, CaSSi. É conhecido que, para que haja precipitação de hidroxiapatita sobre a superfície de um material a partir de solução SBF, o mesmo deve apresentar uma superfície estável. Essa característica não foi observada para os cimentos CaSs, que está relacionado com sua alta taxa de degradação, fazendo com que não ocorresse precipitação em toda a superfície da peça e, desta forma, não pode ser considerado bioativo.

Figura 45. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos discos de CaS imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.



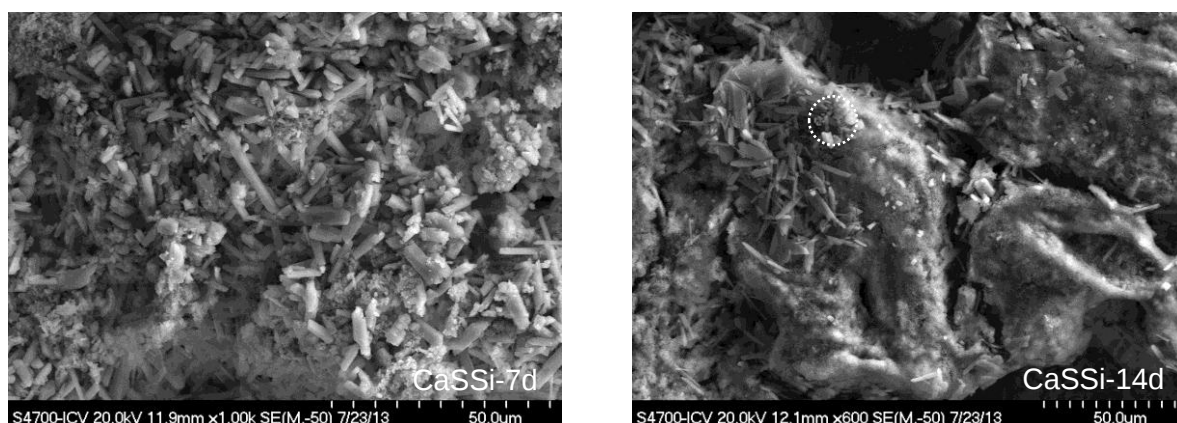
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 46. Espectro de EDS para o cimento CaS após imersão em solução de SBF por 14 dias.



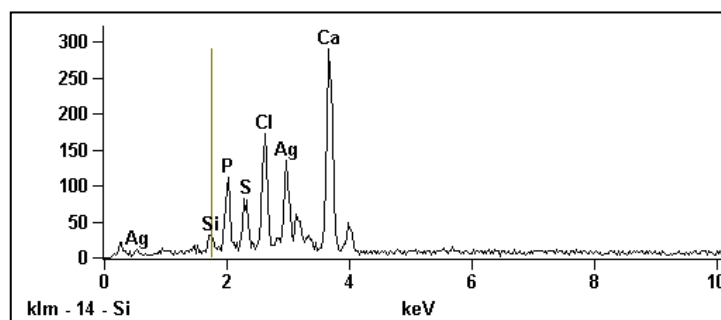
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 47. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos discos de CaSSi imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.



Fonte: Elaborado pela autora

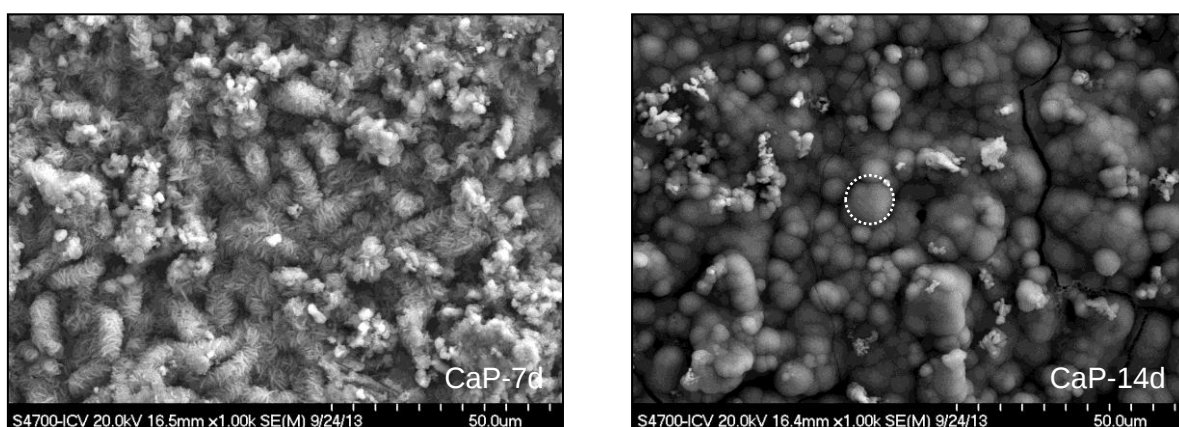
Figura 48. Espectro de EDS para o cimento CaSSi após imersão em solução de SBF por 14 dias.



Fonte: Elaborado pela autora

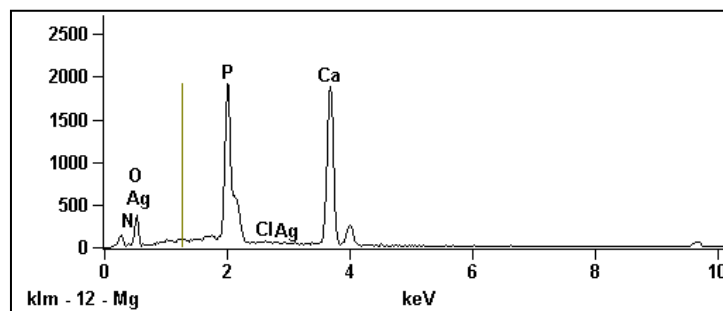
Observando as imagens dos cimentos CaP e CaPSi após 7 dias em imersão em solução SBF, percebe-se que suas superfícies apresentaram estruturas semelhantes em forma de agulhas que se direcionam para todos os lados (Figura 49 e 51). Com o aumento do tempo de imersão para 14 dias, a quantidade de cristais sobre ambas as superfícies aumentou, formando uma camada mais densa. O gráfico de EDS (Figura 52) mostra que na amostra CaPSi não foi detectada a presença das partículas de sílica mesoporosa na superfície da amostra após 14 dias de imersão, devido a precipitação homogênea de cristais de apatita sobre a superfície do corpo de prova.

Figura 49. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos discos de CaP imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.



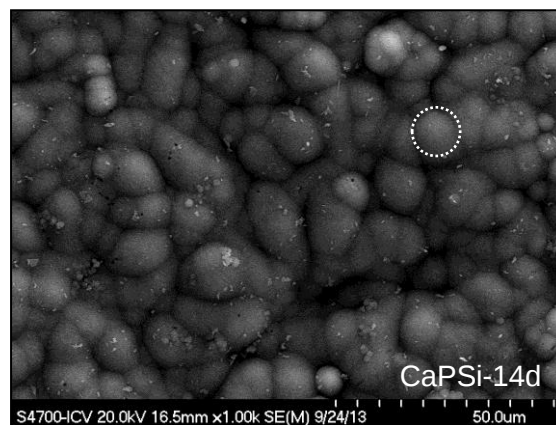
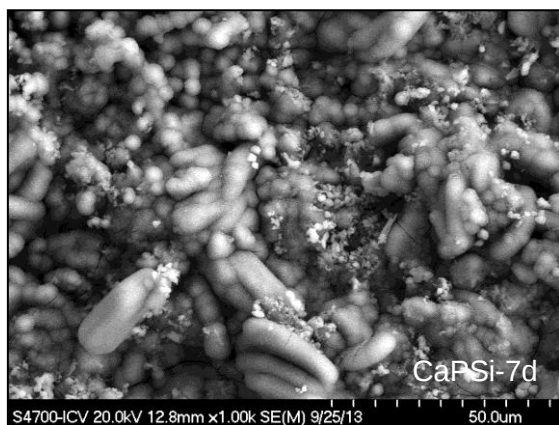
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 50. Espectro de EDS para o cimento CaP após imersão em solução de SBF por 14 dias.



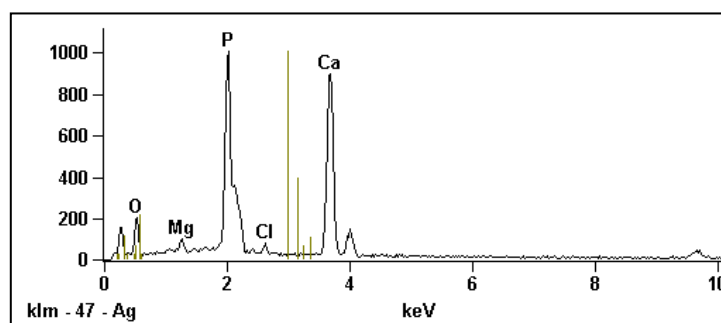
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 51. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos discos de CaPSi imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 52. Espectro de EDS para o cimento CaPSi após imersão em solução de SBF por 14 dias.

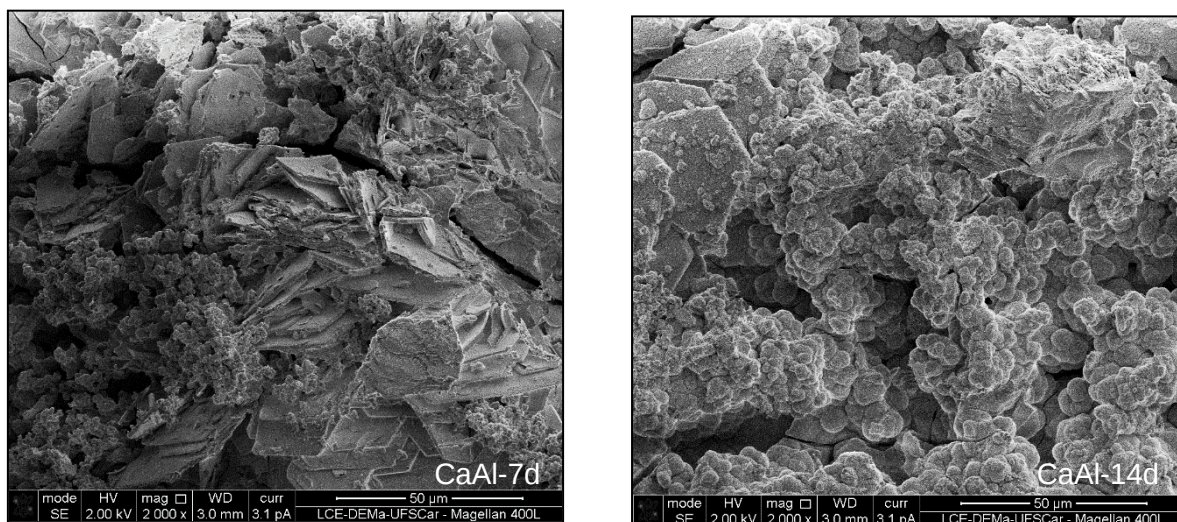


Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com as imagens de microscopia eletrônica de varredura, observou-se um crescimento de cristais sobre a superfície das formulações CaAls. Logo na primeira semana (Figura 53) houve o aparecimento de pequenas partículas esféricas sobre a amostra CaAl. Após 14 dias, essas partículas globulares se tornaram mais frequentes tornando-se um arranjo predominante sobre a amostra, composto por

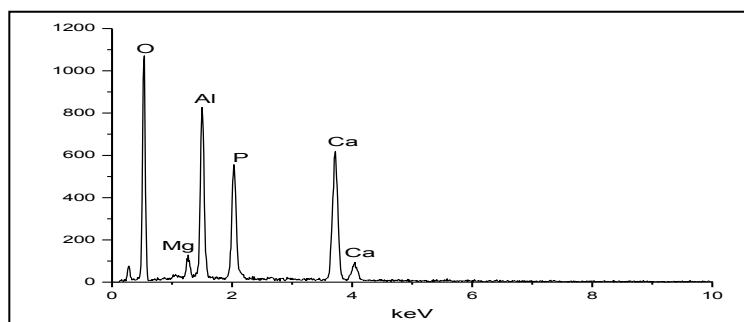
diminutos cristais semelhantes aos cristais de apatita após ensaios de bioatividade in vitro usando a solução SBF (YAN et al., 2006). Em relação a amostra CaAlSi, após imersão por 7 dias, pequenos cristais agregados foram observados sobre a sua superfície (Figura 55), compostos por fosfato de cálcio (Figura 56). Assim como aconteceu com os outros cimentos, a quantidade de cristais sobre a superfície dos materiais continuou a aumentar com o aumento do tempo de imersão, formando arranjos globulares constituídos por inúmeros cristais.

Figura 53. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos discos de CaAl imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.



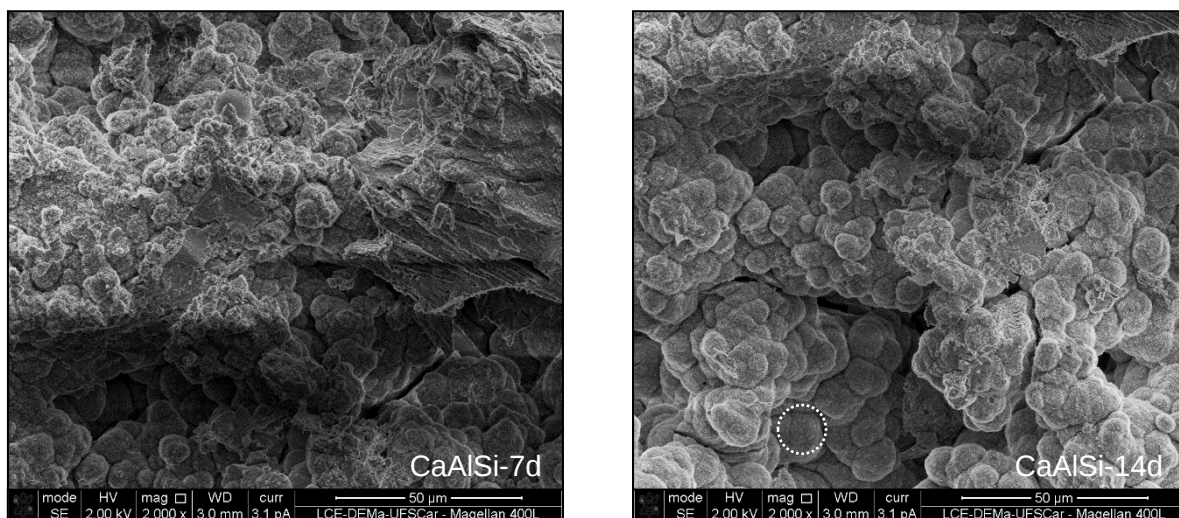
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 54. Espectro de EDS para o cimento CaAl após imersão em solução de SBF por 14 dias.



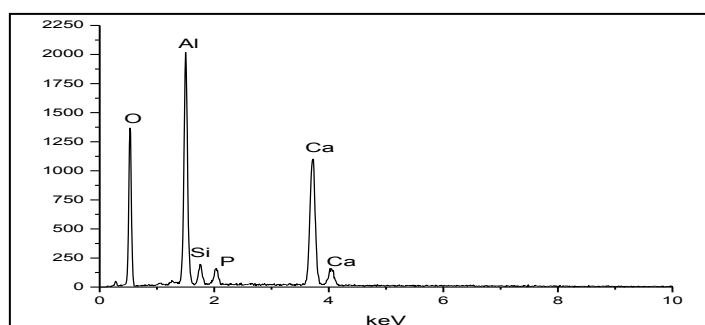
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 55. Imagens de SEM das superfícies dos discos de CaAlSi imersos em solução SBF por 7 e 14 dias.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 56. Espectro de EDS para o cimento CaAlSi após imersão em solução de SBF por 14 dias.



Fonte: Elaborado pela autora

É conhecido que a formação de apatita sobre a superfície de um material depende do fluído corpóreo supersaturado em íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} e uma vez que o sítio de nucleação da apatita é formado sobre um material dentro do organismo, ele continua a crescer espontaneamente pelo consumo desses íons presentes no fluído do corpo (TAKADAMA; KOKUBO, 2008). Porém o processo de deposição atua em uma taxa baixa com ausência da formação de uma camada de apatita homogênea nas fases iniciais da implantação (HE et al., 2012).

Estudos têm comprovado que os biovidros são capazes de formar apatita sobre sua superfície após imersão em solução de SBF (KOKUBO, KIM, KAWASHITA, 2003; PADILLA et al, 2006; SAN MIGUEL et al., 2010). Com a adição de sílica mesoporosa nos cimentos ocorre formação de uma camada de sílica hidratada, que fornece sítios favoráveis à nucleação para os cristais de apatita.

De acordo com LeGeros (1981), a morfologia globular observada nas imagens de microscopia eletrônica de varredura após a imersão em SBF está relacionada à presença de hidroxicarbonato de apatita (HCA). A concentração de íons carbonato (CO_3^{2-}) na molécula de HA define sua morfologia, variando de cristais aciculares a globulares, que deve ter uma espessura e uma estabilidade adequada, pois vai influenciar na adesão de células, orientando, por exemplo, a formação de tecido conjuntivo (LI, P. et al., 1992).

As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que os materiais estudados são capazes de formar hidroxiapatita, com ou sem partículas de sílica dentro de 7 dias, e que o número e o tamanho dos cristais aumentaram com o tempo de imersão, indicando que os cimentos estudados possuem excelente bioatividade, exceto os cimentos CaS e CaSSi.

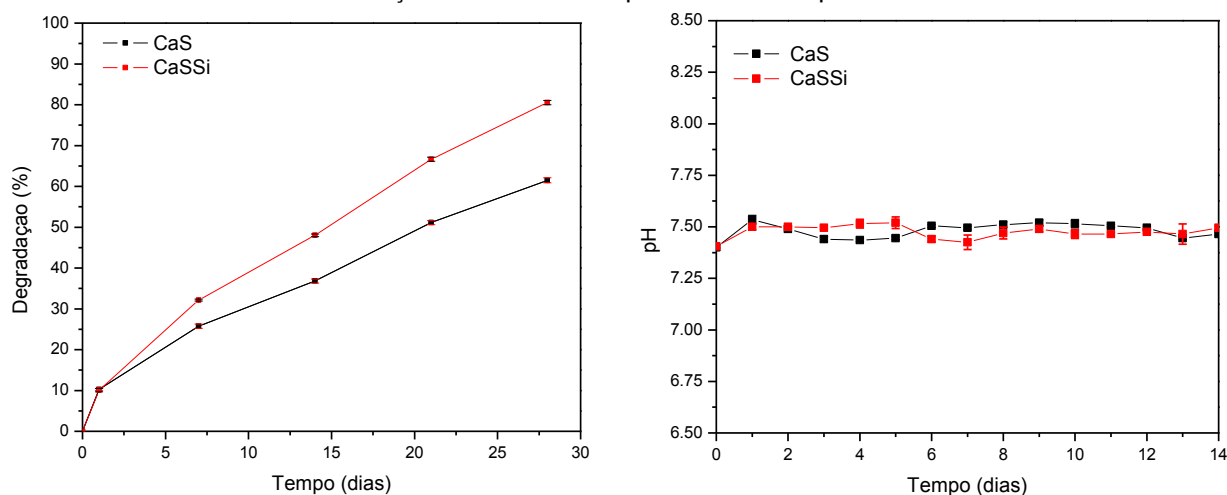
As taxas de degradação das amostras dos cimentos foram caracterizadas pela perda de massa em solução SBF em até 28 dias de imersão. As concentrações de Ca, P e Si foram analisadas por ICP, que é baseado na vaporização, dissociação e excitação dos diferentes elementos químicos de um material no interior de um plasma. Durante o processo de desexcitação, os átomos neutros e íons presentes no plasma emitem radiação eletromagnética, na zona do UV-visível, característica de cada elemento.

A ideia do teste de degradação *in vitro* é tentar prever o comportamento de degradação do material durante a liberação do peptídeo OGP, porém, a reprodução em laboratório das condições presentes no processo de degradação *in vivo* é impossível. A degradação *in vivo* envolve uma série de fatores que podem afetar a cisão hidrolítica das cadeias, e que vão desde a aplicação de tensões, até a existência de respostas celulares e enzimáticas (HOFFMAN, 1992).

As Figuras 57, 59 e 61 mostram a degradação dos cimentos CaS, CaP e CaAl, sem e com sílica, e alterações no pH após imersão em solução SBF por vários períodos de tempo. Foi observado que a taxa de degradação dos cimentos com sílica mesoporosa (CaSSi, CaPSi e CaAlSi) foi maior que a taxa dos cimentos sem essas partículas na composição. Pode-se presumir que a taxa de degradação será maior quanto maior será a quantidade de sílica na composição (HUAN; CHANG, 2009).

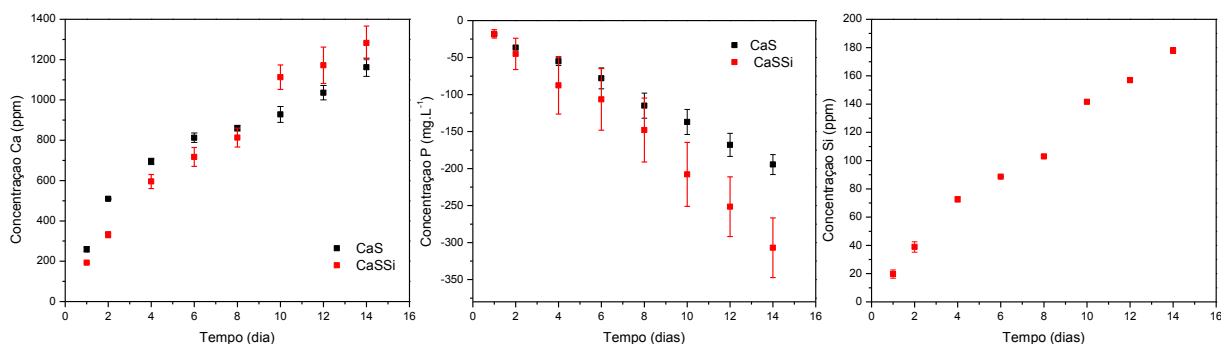
Os cimentos CaS e CaSSi mostraram maior degradação entre as formulações estudadas, onde a degradação foi contínua durante o período analisado. O cimento com sílica mesoporosa mostrou degradação um pouco mais acentuada que o CaS, alcançando cerca de 80% de perda de massa após 28 dias de imersão. Mesmo com alta taxa de degradação, os valores de pH se mostraram praticamente constantes para ambos os cimentos, permanecendo próximo a 7,5. As análises da solução SBF remanescente, durante o mesmo período, mostraram um crescente aumento da concentração de Ca e Si (Figura 58), comprovando os dados de perda de massa. É interessante observar a redução de concentração de fosfato na solução, que demonstra a interação do material com a solução e resulta na precipitação de cristais de apatita, como mostrado pelas imagens de microscopia.

Figura 57. Degradação e mudanças nos valores de pH dos cimentos CaS e CaSSi após imersão em solução SBF em vários períodos de tempo.



Fonte: Elaborado pela autora

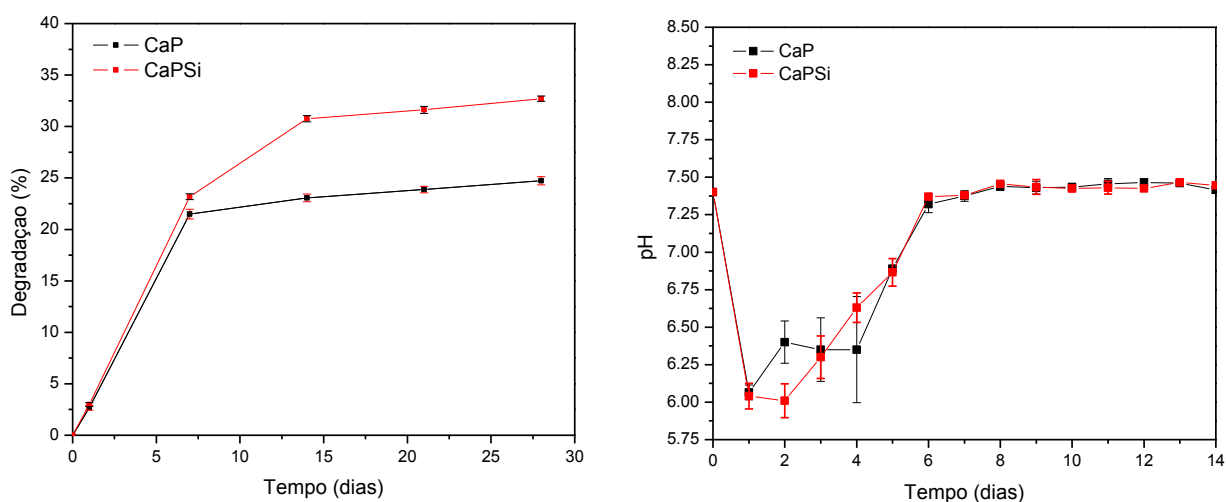
Figura 58. Análise das soluções SBF remanescentes após imersão dos cimentos CaS e CaSSi.



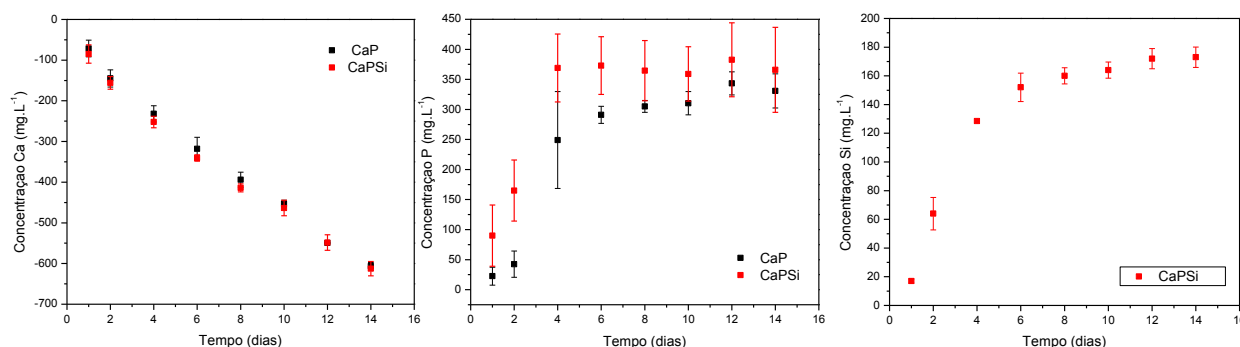
Fonte: Elaborado pela autora

A taxa de degradação dos cimentos CaP e CaPSi foi maior durante os primeiros 7 dias de imersão. Entre 7 e 28 dias a taxa de degradação foi menor, porém o cimento CaPSi mostrou maior porcentagem degradada, em torno de 32%, mais uma vez mostrando a importância das partículas de sílica mesoporosa na degradabilidade do material. Em relação aos valores de pH da solução SBF, houve uma redução de 7,4 para 6,0 logo no primeiro dia de análise em ambos os cimentos, porém os valores foram aumentando gradualmente e após o sétimo dia permaneceu constante próximo a 7,5. Quando a solução SBF remanescente foi analisada (Figura 60), pode-se observar que a degradação de ambos os cimentos é governada pela liberação de Si e P, já que não ocorre aumento da concentração de Ca na solução. Outro fato relacionado à degradação é que, tanto a concentração de fosfato quanto de Si aumentaram durante os primeiros 7 dias de imersão e não alteram após esse período, sendo esse comportamento muito parecido com a porcentagem de massa perdida.

Figura 59. Degradação e mudanças nos valores de pH dos cimentos CaP e CaPSi após imersão em solução SBF em vários períodos de tempo.



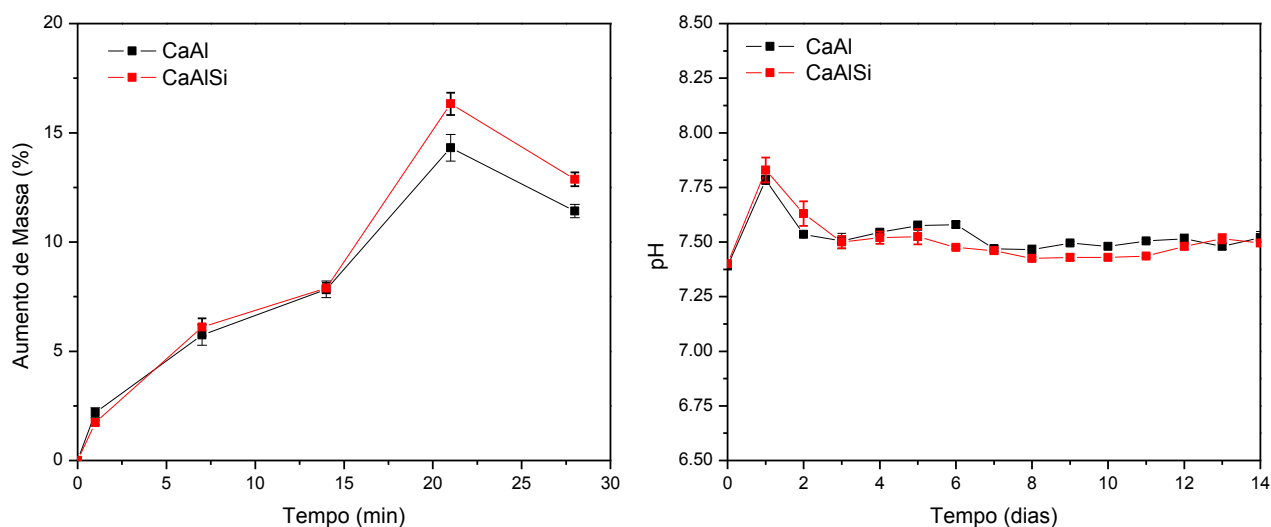
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 60. Análise das soluções SBF remanescentes após imersão dos cimentos CaP e CaPSi.

Fonte: Elaborado pela autora

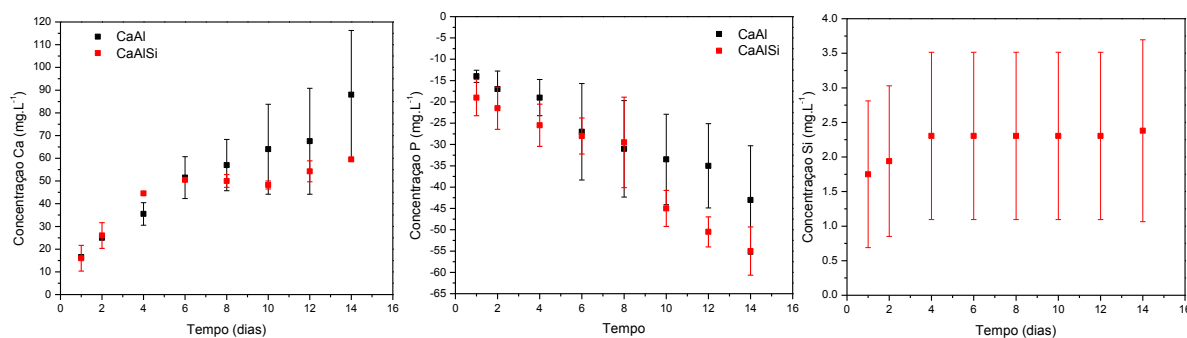
Ao contrário do comportamento de perda de massa apresentados pelos cimentos CaSs e CaPs, os cimentos CaAls mostraram aumento na porcentagem de massa das amostras. Esse aumento iniciou no primeiro dia de imersão e permaneceu até 21 dias. Esse fato se deve, provavelmente, à hidratação das partículas de aluminato de cálcio, pois como outros resultados já demonstraram, um dia somente não foi suficiente para a hidratação total do material. A perda de massa só iniciou a partir de 21 dias de imersão em SBF. A Figura 61 representa as mudanças nos valores de pH causados por esses cimentos; no primeiro dia de imersão houve um ligeiro aumento no pH e estabilizou próximo a 7,5 após 3 dias de imersão. A análise das concentrações de Ca, P e Si na solução de SBF após a imersão dos cimentos estão apresentados na Figura 62. Através dos gráficos de concentração/tempo pode-se observar a redução da concentração de P em ambos os cimentos, que deve estar interagindo com os materiais para a precipitação de apatita na sua superfície como mostrado pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura. O aumento da concentração de Ca e Si foi menor, comparado com os outros cimentos para o mesmo volume de solução, que pode estar relacionado ao resultado de degradação, onde esses cimentos não degradaram durante o período analisado.

Figura 61. Degradação e mudanças nos valores de pH dos cimentos CaAl e CaAlSi após imersão em solução SBF em vários períodos de tempo.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 62. Análise das soluções SBF remanescentes após imersão dos cimentos CaAl e CaAlSi.



Fonte: Elaborado pela autora

É desejável que os biomateriais para preenchimento ósseo sejam degradados com velocidade próxima à formação de um novo tecido ósseo. A capacidade de degradação em meio fisiológico é uma das mais importantes características na aplicação de materiais para reparação óssea. A degradação de um material é primeiramente governada pela composição química e características físicas do material, razão pela qual houve maior degradação pelos cimentos de sulfato de cálcio. Os resultados mostraram ainda que a degradação foi mais lenta nos cimentos CaPs e CaAls e a importância da presença de partículas de sílica mesoporosa no processo de degradação dos cimentos CaSs e CaPs.

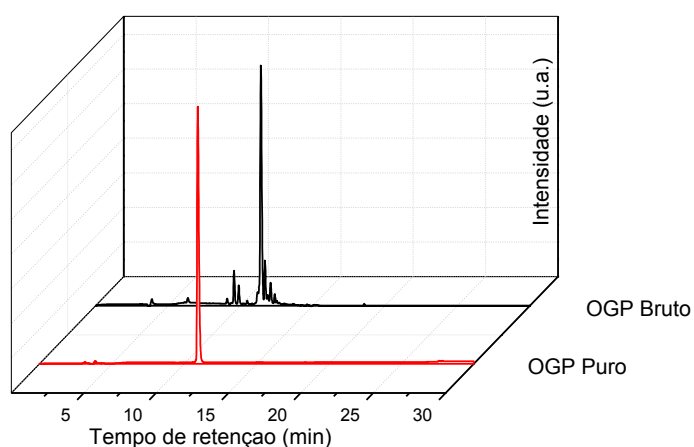
5.3. Síntese, purificação e caracterização do peptídeo OGP e CF-OGP

A síntese Fmoc/tBu é caracterizada por grupos α -amino dos aminoácidos protegidos por uma molécula estável ao TFA e lábil a bases orgânicas, como a piperidina. Logo, as cadeias laterais reativas dos aminoácidos trifuncionais, estão protegidas por grupos t-butílicos ou derivados, os quais são estáveis à bases orgânicas e lábeis ao TFA.

A síntese do peptídeo OGP foi desenvolvida utilizando 1,0 g de resina Fmoc-Gly-Wang, onde ao término da síntese, a massa obtida foi dividida em duas partes, sendo uma delas utilizada para o acoplamento da CF.

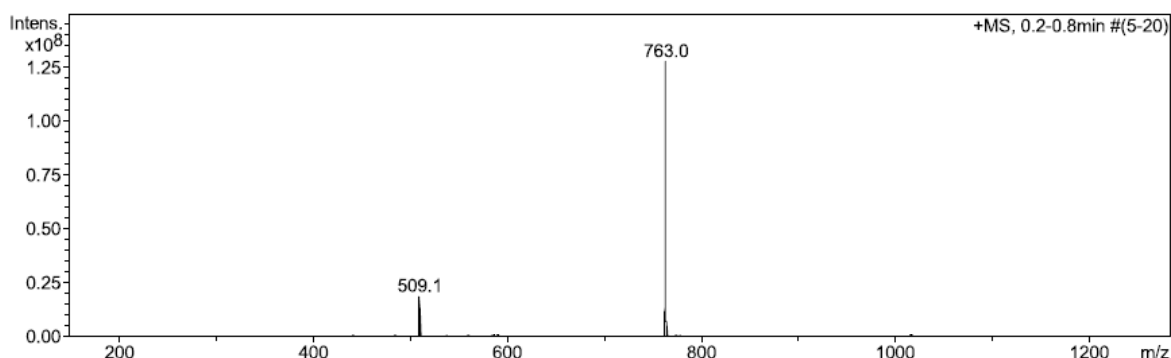
A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos na análise do OGP, foi definida a condição relativa à concentração de solvente para purificação do peptídeo em escala semi-preparativa. O composto bruto foi purificado em modo semi-preparativo, obtendo-se um material com pureza considerável ($\geq 95\%$) (Figura 63).

Figura 63. Cromatogramas do peptídeo OGP bruto e após purificação.



Fonte: Elaborado pela autora

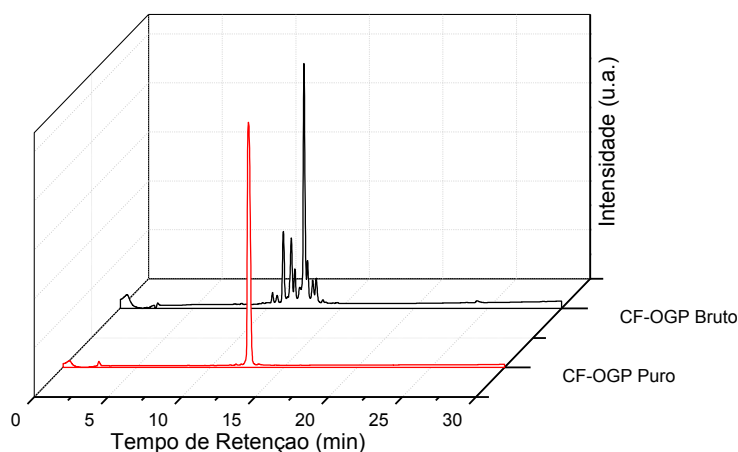
Na Figura 64, a identidade molecular do peptídeo OGP foi confirmada por determinação da correspondente massa molecular, $1.523,8 \text{ g.mol}^{-1}$, determinada pela técnica LC-MS positivo [ES $m/z = 763 (M + 2H)+2$ $509,1 (M+3H)+3$].

Figura 64. Espectro de Massas da fração purificada do peptídeo OGP.

Fonte: Elaborado pela autora

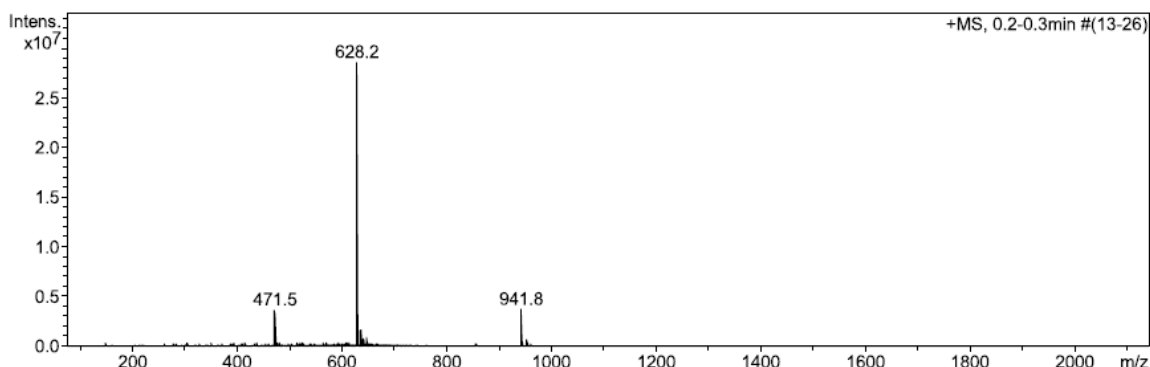
A síntese do peptídeo OGP marcado com 5,6-carboxifluoresceína foi realizada nos mesmos moldes que a síntese descrita anteriormente, onde o restante da peptidil-resina foi utilizada para acoplar a CF.

Os perfis cromatográficos do peptídeo bruto e puro estão apresentados na Figura 65. A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos na análise do CF-OGP, foi definida a condição relativa à concentração de solvente para purificação do peptídeo em escala semi-preparativa.

Figura 65. Cromatogramas obtidos em escala analítica do peptídeo CF-OGP bruto e purificado.

Fonte: Elaborado pela autora

A análise do espectro de massas obtido no modo positivo (Figura 66) confirmou a obtenção do produto esperado. A valor da massa molecular obtida [ES $m/z = 942,8 (M+2H)^{+2}$, $628,2 (M+3H)^{+3}$ e $471,5 (M+4H)^{+4}$] foi correspondente ao valor teórico esperado (1.882,50).

Figura 66. Espectro de Massas da fração purificada do peptídeo CF-OGP.

Fonte: Elaborado pela autora

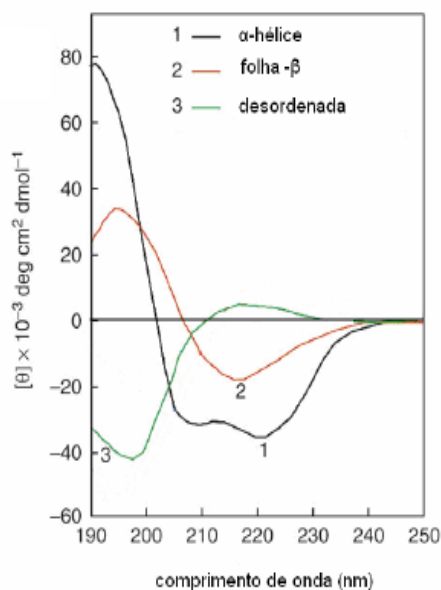
Os perfis cromatográficos das sequências OGP e CF-OGP puras apresentaram um pico único em relação aos cromatogramas observados a partir da análise do peptídeo bruto. Os resultados demonstraram que os procedimentos utilizados desde a síntese até a purificação foram realizados com sucesso, levando à obtenção da sequência desejada.

Os resultados das análises de dicroísmo circular correspondem às únicas informações sobre estrutura secundária do peptídeo sintetizado e está apresentado na Figura 68.

Utilizou-se como referência para a análise dos espectros, a Figura 67, que mostra as diferentes formas de espectros de CD, que são referentes às possíveis estruturas secundárias de proteínas. O perfil 1 representa o espectro característico de estrutura tipo alfa-hélice, apresentando duas bandas negativas, uma em torno de 208 nm e outra em torno de 222 nm e, uma banda positiva em torno de 198 nm; 2 representa o espectro característico de estrutura tipo folha- β e apresenta uma banda positiva em torno de 196 nm e outra negativa em torno de 218 nm; e o 3 representa o espectro característico de estrutura desordenada, apresentando uma banda negativa com mínimo em torno de 198 nm.

Para as proteínas com estrutura aleatória, as interações de longa distância são mínimas e seu espectro é composto por duas bandas características, sendo uma banda negativa, centrada em 195 nm e outra positiva, centrada em 212 nm.

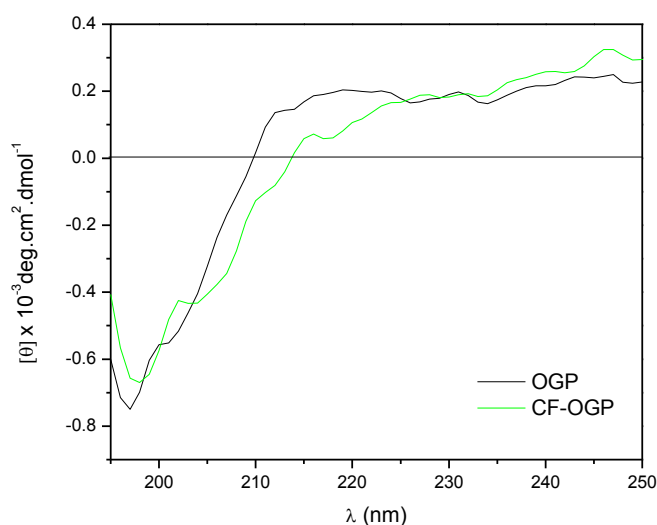
Figura 67. Espectros típicos de CD mostrando o perfil característico de α -hélice, folha- β e estrutura desordenada.



Fonte: WHITMORE; WALLACE, 2007.

De acordo com Bab e Chorev (2002), o peptídeo OGP apresenta sequência pequena e estrutura linear, o que o faz ser altamente susceptível a proteólise. Essa estrutura não definida foi comprovada pelos espectros de dicroísmo circular, onde o peptídeo OGP apresentou curva característica de estrutura desordenada semelhante à curva obtida para o peptídeo CF-OGP. Mesmo que em uma proteína ou peptídeo enovelado o arranjo tridimensional dos cromóforos afete a estrutura eletrônica (ROCHA, C. A. 2014), os resultados mostraram que no caso de sequências sem estrutura secundária isso não ocorre, mantendo a estrutura original.

Figura 68. Espectro de CD do peptídeo OGP puro e CF-OGP.



Fonte: Elaborado pela autora

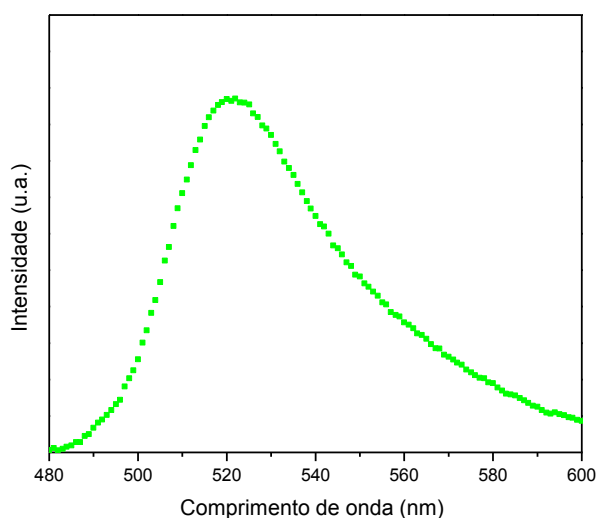
5.4. Incorporação às partículas de sílica mesoporosa e estudo da liberação de CF-OGP em solução de SBF a partir dos cimentos

O peptídeo OGP não possui fluorescência intrínseca, o que não permite o emprego da espectroscopia de fluorescência para sua análise. Assim, para tornar possível o uso dessa técnica, foi acoplada à extremidade N-terminal do peptídeo, uma molécula fluorescente, como descrito anteriormente.

A escolha da Espectroscopia de Fluorescência para monitorar o comportamento do peptídeo em solução frente às partículas de sílica é devido à sua sensibilidade, o que tem permitido sua aplicação em casos que requerem baixos limites de detecção (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009) e os resultados obtidos por Mendes et al. (2013) mostraram que a técnica é confiável para aplicação com CF-OGP.

Foi traçado um espectro de fluorescência do peptídeo CF-OGP livre para determinar o comprimento de onda máximo de emissão (Figura 69), sendo fixado o monocromador de excitação a 492 nm (λ máximo de absorção), de acordo com o fabricante da carboxifluoresceína. Desta forma, fixando os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) em 492 nm e de emissão (λ_{em}) em 520 nm, foi obtida a curva padrão de fluorescência do CF-OGP (em tampão Tris a temperatura ambiente) para auxiliar na quantificação do peptídeo adsorvido nos materiais analisados.

Figura 69. Espectro de fluorescência do peptídeo CF-OGP



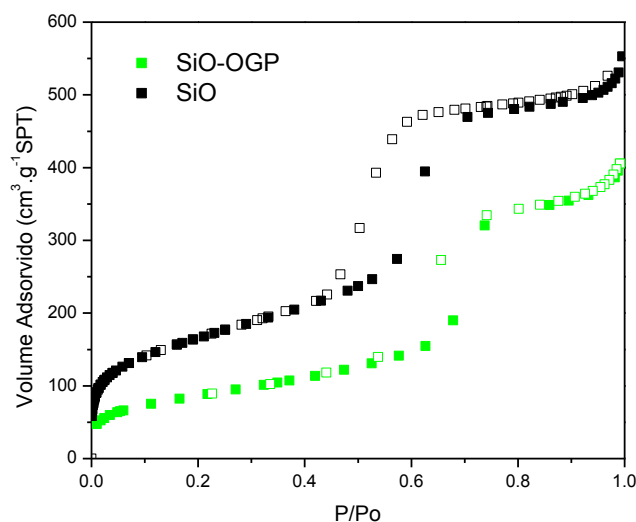
Fonte: Elaborado pelo autora

O número de mols de CF-OGP adsorvidos, partindo de uma solução com concentração em $2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, foi $5,6 \times 10^{-9} \text{ mol}$, correspondendo a 98% de peptídeo OGP teórico nessa solução. Nos estudos Mendes et al. (2013) sobre a adsorção do peptídeo OGP em partículas de sílica mesoporosa, foi observado que em tempo de máxima adsorção, cerca de 30 minutos, e partindo de uma solução com mesma concentração, a adsorção foi de aproximadamente 97% do peptídeo em solução após lavagem das partículas para eliminar o excesso.

Os resultados mostraram que a capacidade de incorporação das partículas é satisfatória. Este fato se deve provavelmente pela afinidade da superfície negativa da sílica com o peptídeo, de carga positiva, em pH 7,4 (MENDES et al., 2013). É conhecido que as biomoléculas e polímeros contendo resíduos carregados positivamente tem uma elevada afinidade com a superfície de sílica, que exibe superfície com carga negativa em pH neutro devido à presença de grupos hidroxil desprotonados na superfície (ETESHOLA; BRILLSON; LEE, 2005; PUDDU; PERRY, 2012). Assim, em relação ao peptídeo OGP, a incorporação favorável do peptídeo pode ser devido à rede de ligações de hidrogênio formadas entre o grupo silanol e as cadeias laterais dos aminoácidos Arg e Lys ou com grupo amino do primeiro aminoácido da sequência, Ala. Além disso, é importante ressaltar a grande área de superfície, homogeneidade dos poros e a exposição dos sítios de adsorção na superfície do material (ARCOS et al., 2009; VALLET-REGÍ et al., 2008).

Uma análise das partículas por adsorção e dessorção de nitrogênio foi realizada após o peptídeo ser incorporado (Figura 70). A amostra de sílica mesoporosa incorporada com o peptídeo apresenta uma isoterma de adsorção semelhante à amostra pura, porém o volume total de N_2 adsorvido é menor, indicando a presença do peptídeo adsorvido na rede do material. A adsorção também é evidenciada pela diminuição da área superficial específica das partículas carregadas, alcançando valores de aproximadamente $304 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, comprovando a presença das moléculas do peptídeo.

Figura 70. Isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio da sílica mesoporosa incorporada com peptídeo OGP.



Fonte: Elaborado pela autora

Houve redução no volume médio dos poros ao incorporar o peptídeo OGP na matriz mesoporosa, com valor inicial foi calculado em $0,75 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ (isoterma da Figura 16) para $0,62 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ após a incorporação. Isso pode ser devido ao fato que as moléculas do peptídeo adsorvidas nos canais não ocuparem completamente o espaço disponível, restando espaço para a adsorção de N_2 (SOUSA; SOUZA; SOUSA, 2008), o que pode sugerir que outras moléculas com atividade biológica, como fármacos, ainda podem ser adsorvidas e resultar em um material multifuncional.

Neste trabalho, a solução SBF foi escolhida para os testes de liberação do peptídeo por possuir concentração iônica semelhante ao plasma sanguíneo, usando a metodologia de dissolução de comprimidos adaptado para o sistema em estudo (SASKA et al., 2012; MENDES et al., 2013).

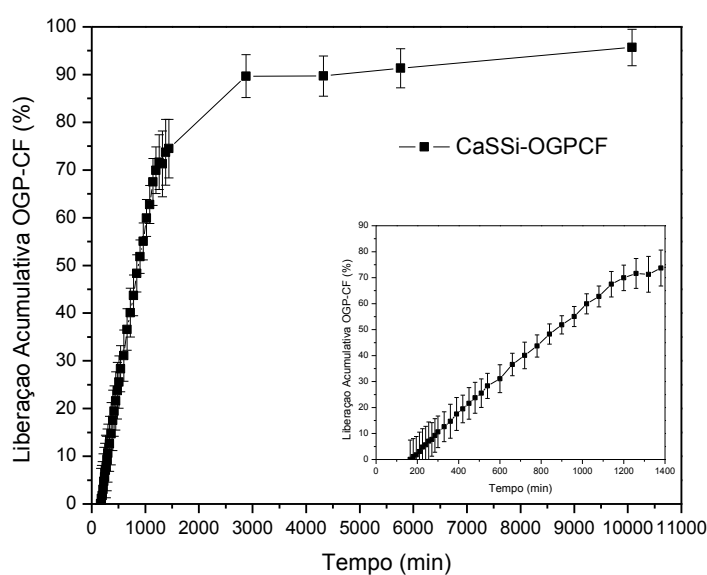
Os perfis de liberação cumulativos do peptídeo OGP plotados em função do tempo a partir dos cimentos CaSS, CaPs e CaAls são apresentados na Figura 71, 72, 73, respectivamente. Os cimentos foram analisados durante 7 dias e o *inset* destaca as primeiras 24 horas de liberação.

Todos os perfis mostram que a liberação do peptídeo CF-OGP para a solução não ocorreu nos primeiros minutos de imersão, o que sugere que o peptídeo não é

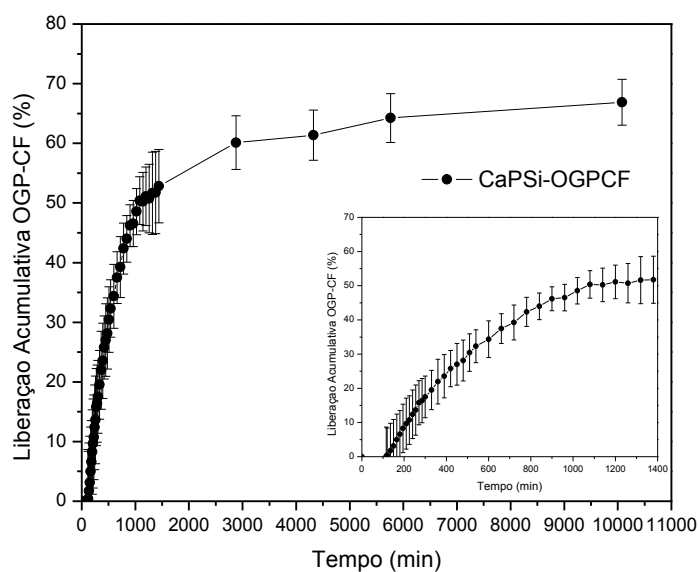
liberado durante a cura dos cimentos. O cimento CaSSi mostrou que o peptídeo começa a ser liberado após 170 minutos de imersão. O gráfico do cimento CaPSi demonstra que a liberação do peptídeo se iniciou após 120 minutos. Já no cimento CaAlSi, a liberação começa após os primeiros 270 minutos.

Mesmo os cimentos estando carregados com a mesma quantidade de peptídeo CF-OGP, o perfil e a quantidade, porcentagem, liberados são diferentes entre eles, podendo estar relacionado às reações e aos produtos de hidratação. Pode-se observar que o cimento CaSSi liberou cerca a $5,5 \times 10^{-9}$ mol, em 7 dias, que representa quase 96% do conteúdo peptídico presente na amostra. Os cimentos CaPSi e CaAlSi liberaram menos peptídeo no mesmo período, sendo aproximadamente 66% ($3,8 \times 10^{-9}$ mol) e 35% ($2,0 \times 10^{-9}$ mol) de peptídeo CF-OGP, respectivamente.

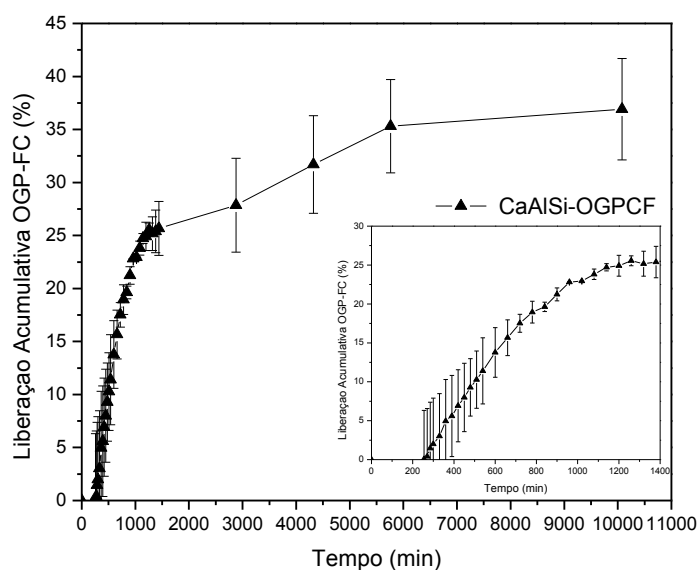
Figura 71. Perfil de liberação acumulativa de CF-OGP a partir do cimento CaSSi; *inset* destacando a liberação nas primeiras 24 horas.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 72. Perfil de liberação acumulativa de CF-OGP a partir do cimento CaPSi.

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 73. Perfil de liberação acumulativa de CF-OGP a partir do cimento CaAlSi.

Fonte: Elaborado pela autora

Os perfis de liberação foram analisados de acordo com o modelo de Higuchi, que admiti que a molécula na camada superficial do sistema dissolve-se na matriz e difunde-se para o meio (HIGUCHI, 1963; COSTA; LOBO, 2001). No caso de fármacos dispersos em uma matriz cerâmica porosa, a liberação é governada por

um mecanismo que pode ser explicado por esse modelo, que é fundamentado na primeira Lei de Fick.

Em geral é possível resumir o modelo de Higuchi a seguinte equação (15), conhecida como modelo de Higuchi simplificado:

$$a = Kt^{1/2} \quad \text{eq.(15)}$$

onde a é a quantidade de peptídeo liberado, K é a constante de liberação e t é o tempo.

A quantidade de peptídeo liberada em função da raiz quadrada do tempo foi avaliada e uma regressão linear a partir do início da liberação foi usada para ajustar os dados, com $R^2 \geq 0,98$. Para isso foi admitido como limite analisado 80%, 50%, 25% para os cimentos CaSSi, CaPSi e CaAlSi, respectivamente. A análise dos resultados mostra que a liberação do peptídeo ajusta-se ao mecanismo de difusão, característico de sistemas de liberação utilizando partículas mesoporosas como carreadores (SHEN et al., 2011). A taxa de liberação estimada pela constante cinética K foi avaliada e os valores são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos de liberação do peptídeo CF-OGP.

Amostra	K (%OGP/min ^{1/2})	R
CaSSi-CFOGP	3,2%	0.99
CaPSi-CFOGP	2,2%	0.985
CaAlSi-CFOGP	1,4%	0.987

Fonte: Elaborado pela autora

Alguns estudos já confirmaram que a liberação de moléculas de antibióticos é dependente da composição do cimento. Pode-se observar que as taxas de liberação do peptídeo foram distintas entre os cimentos. Dentre as amostras, o cimento CaSSi apresentou taxa de liberação maior que os demais cimentos, sugerindo que a degradação do cimento está relacionada com a liberação do peptídeo. Rosenblum e colaboradores (1993) relataram que a liberação de fatores de crescimento a partir de sulfato de cálcio como carreador é diretamente proporcional à sua degradação. Uma alternativa para reduzir a velocidade de degradação e, consequentemente, de

liberação nesses materiais é a adição de fosfatos de cálcio em sua formulação (DOADRIO et al., 2004), ou até o recobrimento com polímero biodegradáveis (BENOIT et al., 1997). Deve-se destacar que a liberação pode ser influenciada também pela quantidade de moléculas incorporadas nas partículas de sílica mesoporosa (MENDES et al., 2013). Li H. e colaboradores (2015) mostraram que a liberação do fármaco vancomicina a partir de partículas de sílica em cimentos de sulfato de cálcio mostraram que quanto maior a quantidade de fármaco nas partículas, maior a velocidade de liberação. Além disso, o cimento de sulfato de cálcio com essas partículas promoveram liberação mais lenta da vancomicina durante as primeiras 24 horas, onde após 10 dias de ensaio foi liberado 89% do fármaco.

Em relação ao cimento CaPSi, a liberação foi proporcional a $t^{1/2}$ até 50% do peptídeo liberado e a velocidade de liberação estabilizou após este valor, mas a quantidade total do peptídeo presente nesse cimento não foi liberado ao final das leituras. Resultados semelhantes foram apresentados por Bohner e colaboradores (1997b), quando estudaram a liberação de gentamicina a partir de cimentos hidráulicos de bruxita, compostos por β TCP-MCPM, porém a quantidade total do antibiótico presente no cimento foi liberado em 7 dias.

O cimento CaAlSi seguiu o modelo de Higuchi nas primeira horas de liberação do peptídeo, sendo proporcional a $t^{1/2}$ até 25% de peptídeo liberado. É conhecido que a liberação de fármaco em cimento de aluminato de cálcio, utilizando microesferas poliméricas como partículas carreadoras, apresenta liberação lenta (NAITO et al., 2014). Pouca quantidade é liberada na primeira semana, porém a liberação continua mesmo depois de um mês, podendo estar relacionado ao seu longo período de hidratação e baixa porcentagem de degradação.

Alguns trabalhos têm mostrado que a taxa de degradação e a porosidade instável dos cimentos biocerâmicos influenciam na liberação de moléculas (OTSUKA et al., 1997; TUNG, 1995). Assim o modelo de Higuchi seria válido para os primeiros estágios de liberação, seguido por outras etapas onde a liberação é proporcional ao tempo ou é estabilizada e a concentração da molécula no meio aumenta (GINEBRA; TRAYKOVA; PLANELL, 2006b).

Esses resultados demonstraram que a liberação das moléculas do peptídeo OGP está relacionada com a degradação do cimento, onde o cimento que

apresentou maior taxa de degradação, foi o que mostrou maior liberação, no caso o CaSSi. Assim, pode-se destacar, que durante o processo de liberação do peptídeo OGP, ocorreram alguns fenômenos que podem estar agindo sobre o perfil e quantidade de peptídeo liberado, que são:

1. Difusão do meio líquido para o cimento;
2. Hidratação do cimento devido à difusão;
3. Liberação das moléculas de peptídeo para a solução;
4. Precipitação de cristais de hidroxiapatita, devido ao uso de solução SBF;
5. Degradação do cimento.

Sabe-se que nos materiais mesoporosos SBA-15, sintetizados a partir de Pluronic® 123, há a possibilidade da presença de microporos em suas paredes, que compreendem uma conexão entre os mesoporos (IMPEROR-CLERK; DAVIDSON; DAVIDSON, 2000). Uma vez presente na estrutura da sílica, as moléculas do peptídeo OGP podem ocupar tanto os mesoporos como também os espaços de interconexão entre eles. Assim, antes da liberação ocorrer, o peptídeo tem que difundir-se de dentro dos poros para a solução.

Além disso, a precipitação da camada de hidroxiapatita sobre os cimentos reduz a abertura dos poros superficiais, formando uma barreira para a saída das moléculas do peptídeo, principalmente aquelas presentes mais ao centro do cimento.

Mesmo com perfis de liberação diferentes, a análise dos resultados dos testes de liberação permitiu observar que todos os sistemas liberaram quantidade de peptídeo OGP suficiente para possível aplicação clínica. Sun e Ashhurst (1998) realizaram aplicações intravenosas com 700ng de OGP em coelhos diariamente durante o período pós-cirúrgico e observaram que dez aplicações são suficientes para que ocorra a atividade máxima do peptídeo. Já foi observado que a liberação de $6,0 \times 10^{-12}$ mol de OGP por membranas de celulose bacteriana é capaz de estimular a proliferação de células osteoblásticas (SASKA et al., 2012).

A quantidade de mols do peptídeo OGP incorporado nas partículas de sílica mesoporosa foi baseado nos resultados de estudos in vivo, após realização de defeitos ósseos e aplicações intravenosas de soluções desse peptídeo (BAB et al.,

1992; SUN, ASHHURST, 1998; BRAGER et al., 2000; GABET et al., 2004). Levando em consideração que a atividade do peptídeo OGP ocorre quando em concentrações muito baixas no sangue e de acordo com as aplicações intravenosas, o ideal seria que os cimentos liberassem cerca de $0,121 \times 10^{-10}$ mol (<1% do conteúdo adsorvido) por dia durante pelo menos 28 dias, para que correspondesse à quantidade aplicada nos trabalhos com aplicações via intravenosa. Desta forma, os resultados obtidos nesse trabalho já excluiriam o cimento CaSSi.

5.5. Análises in vitro

5.5.1. Cultura Celular CHO-K1

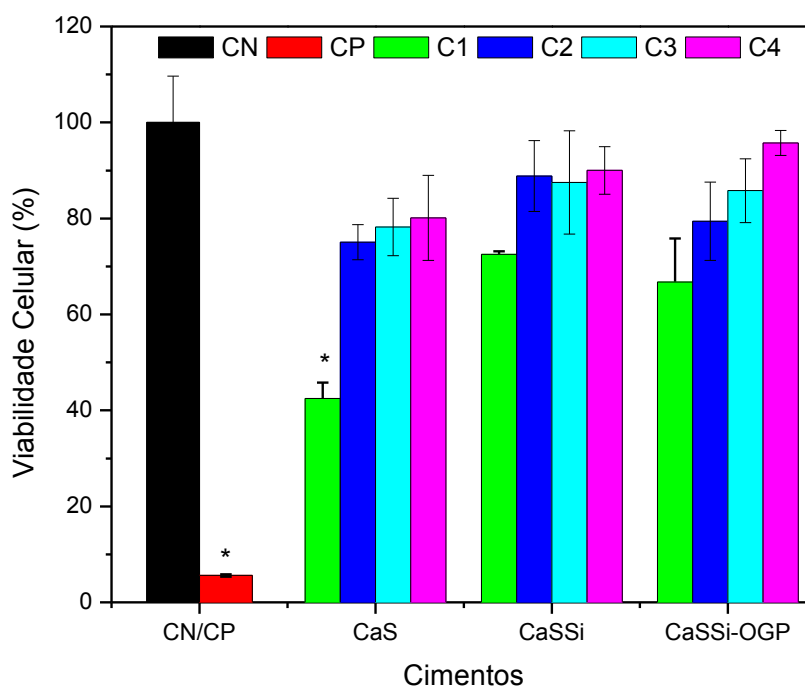
Ensaio de Citotoxicidade

As Figuras 74, 75 e 76 mostram a média e o erro padrão para viabilidade celular obtida pelo ensaio XTT para as amostras CaS, CaP e CaAl, respectivamente, com e sem sílica mesoporosa e peptídeo OGP, onde a viabilidade celular está relacionada com a medida de absorbância e o Controle Negativo (CN) foi considerado como 100% de viabilidade celular.

Em relação ao cimento CaSs, foi observado que somente o extrato original (C1) da amostra CaS apresentou diferença significativa em relação à viabilidade celular do CN, reduzindo-a para aproximadamente 43%, porém suas demais diluições não foram citotóxicas. Já o cimento CaSSi e CaSSi-OGP, sem e com o peptídeo, não apresentou citotoxicidade em nenhuma concentração, isto é, não demonstraram diferença estatisticamente significante quanto à viabilidade celular em relação ao controle negativo ($p > 0,05$). Cimentos de sulfato de cálcio hemihidratado preparados com água deionizada apresentam significativa viabilidade celular após 2 dias em contato direto com células tronco e também adesão celular sobre a sua superfície (CHEN, Z. et al., 2013). É conhecido que o sulfato de cálcio hemihidratado pode atuar como preenchimento em regeneração óssea guiada (LIAO et al., 2010; QI et al., 2012), mas também como um acelerador na cicatrização do tecido (WALSH et al., 2003). Essa interação do sulfato de cálcio hemihidratado com as células

sugere que esse material pode promover um ambiente biológico satisfatório para adesão, proliferação e migração celular.

Figura 74. Ensaio XTT. As colunas indicam o valor médio de viabilidade celular (%) para os materiais CaS, CaSSi e CaSSi-OGP. Barras indicam o erro padrão; (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, citotoxicidade baixa ($p < 0,05$; Tukey).



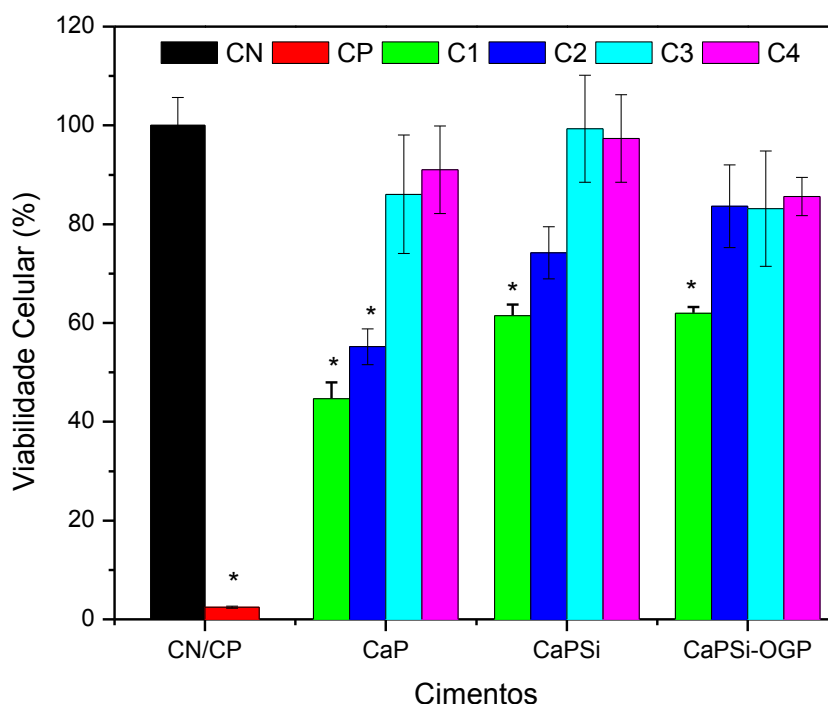
Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com a Figura 75, os extratos com concentrações C1 dos cimentos CaP, CaPSi e CaPSi-OGP apresentaram resultados estatisticamente diferentes do CN, pois apresentaram viabilidade celular estatisticamente diferente em relação ao Controle Negativo ($p < 0,05$), mas em relação aos cimentos com partículas de sílica mesoporosa, CaPSi e CaPSi-OGP, a viabilidade celular das concentrações C1 foi maior que 60%. Quando as células foram tratadas com os extratos menos concentrados, verificou-se que nenhum dos materiais prejudicou a viabilidade celular, apresentando-se não citotóxicos, já que não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle Negativo ($p > 0,05$).

Foi observado que todas as amostras dos cimentos CaP e CaAl alteraram a coloração do meio de cultura (Figura 76), indicando teoricamente uma mudança no pH do mesmo, pois o meio de cultura inicial possui coloração vermelho-rosa devido

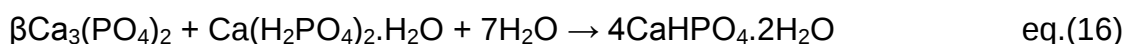
ao indicador *fenol red* e um pH ajustado para 7,2. O clareamento da coloração do meio indica a redução no pH, que foi confirmado estar próximo a 6,0 pelo uso de um pHmetro.

Figura 75. Ensaio XTT. As colunas indicam o valor médio de viabilidade celular (%) para os materiais CaP, CaPSi e CaPSi-OGP. Barras indicam o erro padrão; (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$; Tukey).



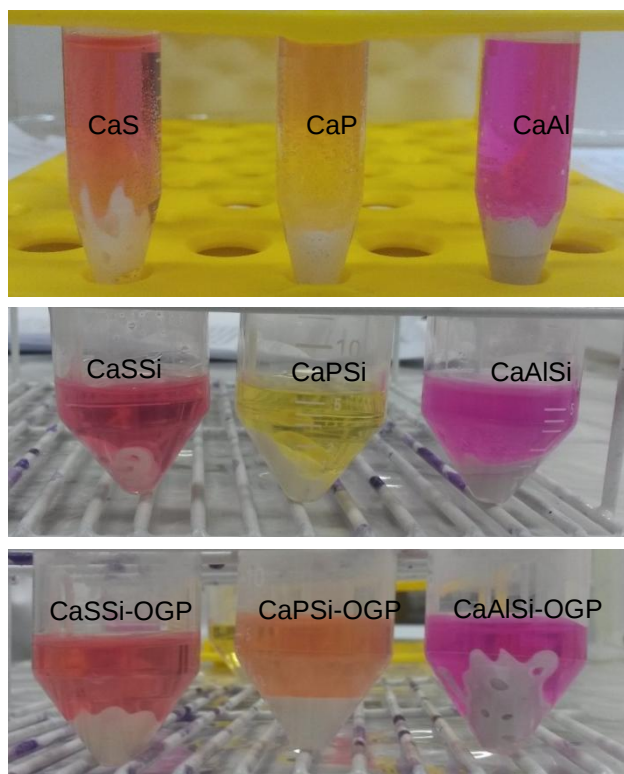
Fonte: Elaborado pela autora

Cimentos feitos da mistura de β -TCP, MCPM e água segue a Equação 16.



O produto da reação de cura dessa reação é o fosfato dicálcico dihidratado ou DCPD e o pH pode ser determinado pela ocorrência de três reações seguidas: dissolução do MCPM; dissolução do β -TCP; e precipitação de DCPD. Assim, o pH é principalmente determinado pela dissolução de MCPM, promovendo redução nos valores de pH. Bohner e colaboradores (1997a) observaram que em estudos de degradação in vitro de cimentos β -TCP-MCPM em água deionizada, quando há excesso de β -TCP, como é o caso da formulação estudada, o pH final é determinado por um equilíbrio entre cristais de DCPD e β -TCP remanescente e alcança valores moderadamente ácido.

Figura 76. Coloração dos meios de cultura após contato com os cimentos por 24 horas.



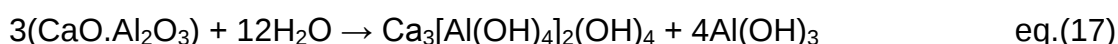
Fonte: Elaborado pela autora

No entanto, deve-se levar em consideração que esta formulação de cimento mostrou retornar o valor de pH em torno de 7,0 após 5 dias quando imerso em solução SBF, como mostrou nos testes de bioatividade *in vitro*. De acordo com Alge e colaboradores (2012), a conversão de DCPD em HA, em estágios posteriores, produz ácido fosfórico e pode causar implicações na biocompatibilidade. Desta forma, a redução do pH resultante da conversão DCPD pode ter um efeito citotóxico. Porém esses autores mostraram que o cimento base β TCP-MCPM preparado com solução de citrato de sódio não se mostrou citotóxico quando em contato indireto com células tronco mesenquimais por 48 horas. Assim, a redução da viabilidade em C1 pode estar relacionado a redução do pH do meio devido aos cimentos β TCP-MCPM apresentarem cura de característica ácida.

A Figura 77 apresenta os resultados obtidos no teste de viabilidade celular pelos cimentos CaAls. Pode-se observar que todos os extratos originais (C1) e mostraram-se citotóxicos, apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle Negativo ($p < 0,05$), onde a viabilidade celular foi menor que 40%. Além disso, C2 e C3 dos cimentos com partículas de sílica, CaAlSi e CaAlSi-OGP,

ainda se mostram diferentes do observado em CN. É conhecido que o cimento CAC+, composto por aluminato de cálcio e com cerca de 68,5% de Al_2O_3 , não apresentando citotoxicidade em cultura de fibroblastos (SILVA et al., 2012), assim como EndoBinder e MTA (SILVA et al., 2014). No entanto, a viabilidade celular em cultura de osteoblastos mostrou ser significativamente diferente do controle negativo após 24 horas de contato direto, porém após 7 dias não houve diferença (RAUCCI, 2013).

O valor do pH do meio de cultura após contato de 24 horas com os cimentos CaAls mostrou estar próximo a 10,0. Um dos fatores que pode influenciar na resposta citotóxica é a alcalinização do meio por parte desse cimento. Isso ocorre através da dissociação dos íons cálcio e hidroxilas quando o material entra em contato com a água (SILVA et al., 2014). Valores de pH na faixa alcalina promoveram uma melhor atividade antimicrobiana, relacionada com a liberação de íons hidroxilas e aumento do pH, o que gera um ambiente desfavorável para as bactérias sobreviverem (OLIVEIRA; PANDOLFELLI; JACOBOWITZ, 2010). Sabe-se que, durante a hidratação, cimentos de aluminato de cálcio resultam em aluminato de cálcio hidratado e óxido de alumínio, como mostra a reação (Equação 17).

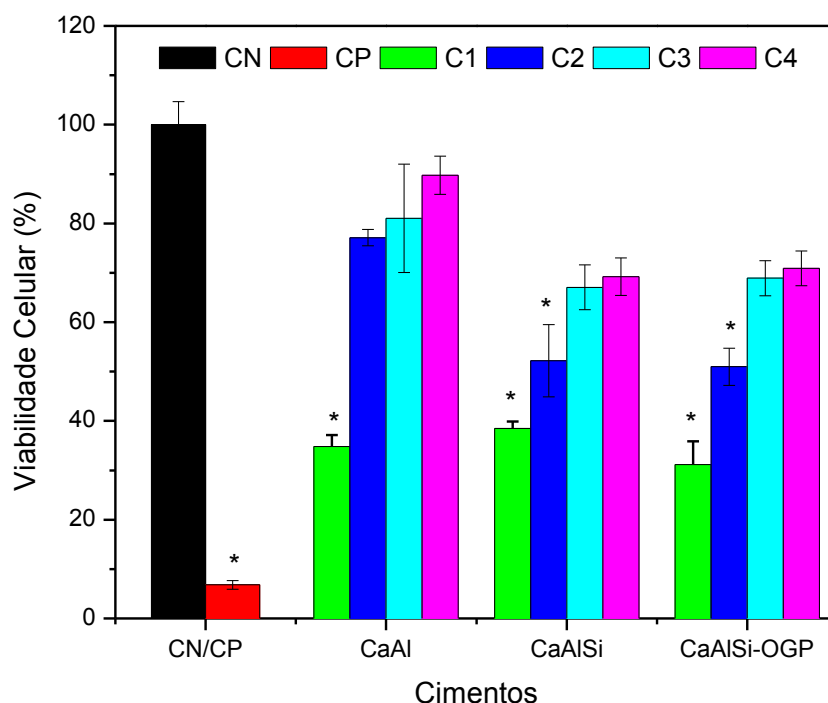


Na presença de excesso de água, o hidróxido de cálcio se solubiliza liberando seus íons conforme a reação (Equação 18):



A liberação de íons Ca^{2+} e OH^- para a solução pode ser atribuída a decomposição do aluminato de cálcio hidratado, que resulta no aumento do pH do meio (SANTOS et al., 2005).

Figura 77. Ensaio XTT. As colunas indicam o valor médio de viabilidade celular (%) para os materiais CaAl, CaAlSi e CaAlSi-OGP. Barras indicam o erro padrão; (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, citotoxicidade leve ($p < 0,05$; Tukey).



Fonte: Elaborado pela autora

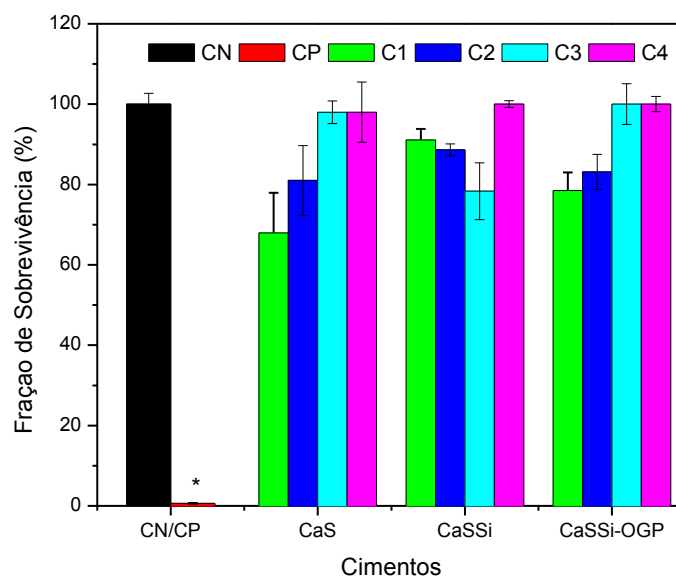
Ensaio de Sobrevivência Clonogênica

As Figuras 78, 79 e 80 mostram a média e o erro padrão da fração de sobrevivência obtidos pelo ensaio de sobrevivência clonogênica para os materiais CaSs, CaPs e CaAls, com ou sem sílica mesoporosa e peptídeo OGP, respectivamente.

Através da avaliação da toxicidade pelo ensaio de Sobrevivência Clonogênica somente C1 dos cimentos CaAl e CaAlSi apresentaram diferença significativa em relação ao CN ($p > 0,05$). Os resultados sugerem que, mesmo que os C1 do cimento CaS e dos cimentos do grupo CaPs mostraram citotóxicos para o teste XTT (Figuras 75 e 76), as células tratadas com os meios condicionados mantêm a capacidade reprodutiva. Esse resultado mostra que essas células são mais sensíveis à valores de pH básicos, como os dos meios condicionados do grupo dos cimentos CaAls e,

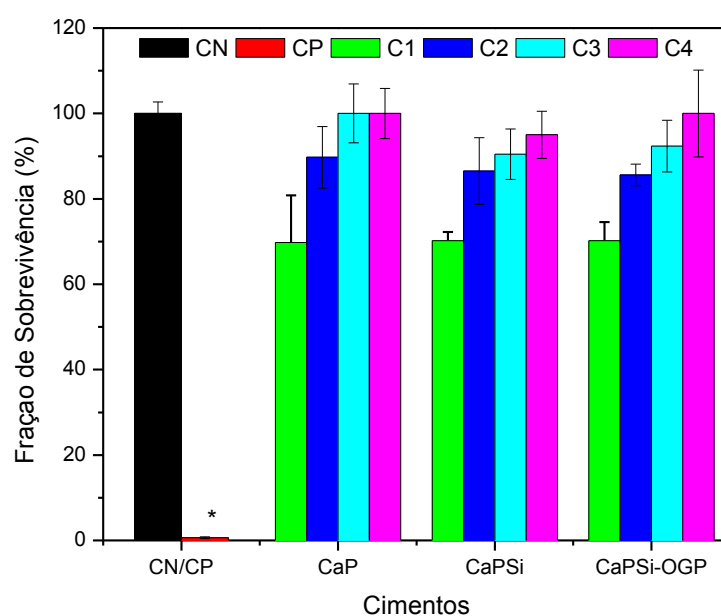
desta forma, prejudica a capacidade reprodutiva dessas células. Pelos resultados obtidos, os testes seguiram somente com os cimentos CaS e CaP.

Figura 78. Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica dos materiais CaS, CaSSi e CaSSi-OGP e suas respectivas diluições. Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. Barras indicam o erro padrão. (*) $p < 0,05$; Tukey).



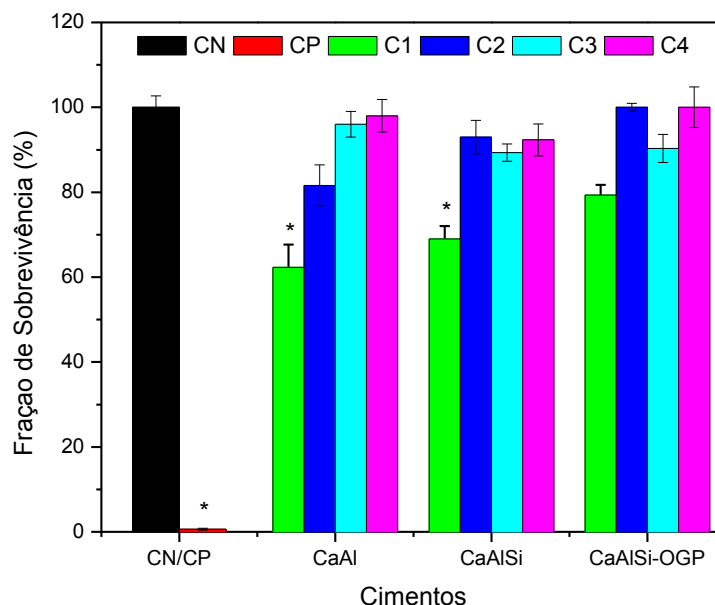
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 79. Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica dos materiais CaP, CaPSi e CaPSi-OGP e suas respectivas diluições. Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. Barras indicam o erro padrão. (*) $p < 0,05$; Tukey).



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 80. Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica dos materiais CaAl, CaAlSi e CaAlSi-OGP e suas respectivas diluições. Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. Barras indicam o erro padrão. (*) $p < 0,05$; Tukey).



Fonte: Elaborado pela autora

Ensaio de Mutagenicidade

Para o teste de avaliação do potencial mutagênico e genotóxico foram selecionados os cimentos que apresentaram os melhores resultados em relação ao teste de viabilidade celular. Dessa forma, os testes seguiram com os cimentos CaS e CaP, com sílica e peptídeo OGP.

A mutagenicidade foi avaliada por meio do ensaio do Micronúcleo e os resultados podem ser visualizados na Tabela 12 e 13, para os materiais CaSSi e CaPSi, com e sem peptídeo OGP, dos extratos originais e suas respectivas diluições, respectivamente.

Em relação às amostras dos cimentos CaSSi e CaSSi-OGP, os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre CN e C1 de ambos os cimentos em relação à FBMN e FMN, apresentando ser maior do que o CN, porém foram diferentes de CP. No entanto, os valores de IDN mostraram que esse parâmetro não foi afetado pelo tratamento das células com os extratos dos cimentos, assim como os valores de frequência de pontes e brotos foram menores que o controle.

Tabela 12. Índice de Divisão Nuclear (IDN), Frequência de Células Binucleadas com Micronúcleo (FBMN) e Frequência de Micronúcleos (FMN), de Pontes Nucleoplasmáticas (PN) e de brotos obtidos para os materiais CaSSi e CaSSi-OGP e respectivas diluições. Valores médios e erro padrão.

Grupo	IDN	FBMN	FMN	Pontes	Brotos
CN	1,94 ± 0,01	9,67 ± 0,42	9,67 ± 0,42	17,33 ± 1,12	17,33 ± 2,23
CP	1,77 ± 0,01*	87,33 ± 3,19*	142,3 ± 4,28*	43,00 ± 1,46*	101,7 ± 2,23*
CaSSi-C1	1,87 ± 0,01	24,67 ± 2,43*	25,67 ± 2,74*	7,67 ± 1,17	6,67 ± 0,92
CaSSi-C2	2,00 ± 0,03	19,67 ± 4,26	21,67 ± 4,70	7,00 ± 1,90	10,33 ± 2,14
CaSSi-C3	1,90 ± 0,01	17,00 ± 0,73	17,00 ± 0,73	12,00 ± 1,67	11,00 ± 1,59
CaSSi-C4	2,00 ± 0,01	10,33 ± 0,76	10,33 ± 0,76	12,67 ± 2,35	7,00 ± 0,37
CaSSi-O-C1	1,86 ± 0,02	33,00 ± 1,32*	34,67 ± 1,12*	11,33 ± 1,12	10,33 ± 2,23
CaSSi-O-C2	2,07 ± 0,05	23,33 ± 4,42	23,67 ± 4,62	8,67 ± 1,52	5,67 ± 1,17
CaSSi-O-C3	1,98 ± 0,01	7,67 ± 0,76	8,00 ± 0,97	4,33 ± 0,92	3,33 ± 0,56
CaSSi-O-C4	2,10 ± 0,01	9,00 ± 0,97	10,00 ± 1,32	3,67 ± 1,38	3,33 ± 0,92

(*) $p < 0,05$ em relação ao CN (Tukey)

Fonte: Elaborado pela autora

No caso dos cimentos CaPSi e CaPSi-OGP, os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e C1 de ambos os materiais em relação aos valores de IDN. Nessa mesma concentração do extrato os valores de FBMN e FMN foram estatisticamente diferentes do controle, assim como a presença de pontes e brotos.

O Teste de MN foi realizado com bloqueio da citocinese, com o intuito de avaliar danos ao DNA e divisão celular (DUAN et al., 2009). Além da frequência de MNs, o teste pode mensurar a presença das pontes nucleoplasmáticas, que indicam o rearranjo de cromossomos, que ocorre quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos ou cromátides são puxados para os polos da célula durante a anáfase ou fusão de telômeros depois de quebras duplas de fita do DNA. Assim como, calcular a frequência de brotos, que é considerado um marcador da instabilidade genômica, porém a sua origem não está completamente esclarecida (UMEGAKI; FENECH, 2000). Acredita-se que represente uma amplificação gênica ou falha no sistema de reparo do DNA (FENECH; CROTT, 2002). Sua importância pode estar relacionada à

teoria de que a sua gênese e a do MN seria semelhante, sendo que qualquer fragmento cromossômico que possa ficar no citoplasma durante a divisão celular seria encapsulado formando um brotamento, que caso viesse a se desconectar do núcleo, levaria a formação de um MN (LINDENBERG et al., 2007).

representam um mecanismo o qual a célula remove amplificação de DNA que é considerado como um marcador de amplificação de 53 genes, originada de fragmentos acêntricos terminal ou intersticial (UMEGAKI; FENECH, 2000).

No entanto, a presença de alguns tipos de aberrações cromossômicas pode não significar a ocorrência de eventos que podem promover mudanças no conteúdo genético da célula, enquanto outros tipos têm apenas caráter preditivo. No caso das pontes, células normais podem ser geradas não predizendo assim a formação de micronúcleos, pois representam somente um atraso mitótico (MAJER et al., 2003).

Ademais, segundo Rahman e colaboradores (2002), a indução de micronúcleos é resultado de um dano genético bastante primário sendo assim precoce a associação desses eventos diretamente ao desenvolvimento de tumores, pois os mecanismos de reparo celular são extremamente eficientes.

Tabela 13. Índice de Divisão Nuclear (IDN), Frequência de Células Binucleadas com Micronúcleo (FBMN) e Frequência de Micronúcleos (FMN), de Pontes Nucleoplasmáticas (PN) e de brotos obtidos para os materiais CaPSi e CaPSi-OGP e respectivas diluições. Valores médios e erro padrão.

Grupo	IDN	FBMN	FMN	Pontes	Brotos
CN	1,96 ± 0,01	9,17 ± 0,42	9,17 ± 0,42	15,84 ± 1,10	10,23 ± 1,03
CP	1,67 ± 0,01*	89,74 ± 3,14*	154,2 ± 2,81*	54,00 ± 1,46*	98,4 ± 2,10*
CaPSi-C1	1,81 ± 0,02*	25,67 ± 1,42*	33,00 ± 1,46*	20,23 ± 0,12*	16,56 ± 1,43
CaPSi-C2	1,95 ± 0,01	12,03 ± 1,70	12,03 ± 1,70	9,53 ± 1,12	2,00 ± 0,26
CaPSi-C3	1,95 ± 0,05	11,25 ± 0,51	11,25 ± 0,51	3,56 ± 0,35	3,76 ± 1,02
CaPSi-C4	2,10 ± 0,01	4,23 ± 0,86	4,23 ± 0,86	5,89 ± 0,86	2,23 ± 0,46
CaPSi-O-C1	1,79 ± 0,01*	26,67 ± 1,05*	32,00 ± 0,97*	28,67 ± 1,11*	16,67 ± 0,84
CaPSi-O-C2	1,92 ± 0,00	14,88 ± 1,12	14,88 ± 1,12	5,87 ± 1,26	3,83 ± 0,43
CaPSi-O-C3	1,95 ± 0,03	9,01 ± 0,41	9,01 ± 0,41	3,79 ± 0,72	3,71 ± 0,58
CaPSi-O-C4	1,89 ± 0,02	5,27 ± 0,52	5,27 ± 0,52	3,83 ± 0,98	3,11 ± 0,87

(*) $p < 0,05$ em relação ao CN (Tukey)

Fonte: Elaborado pela autora

Nas demais concentrações, a ausência de diferença estatística significativa na frequência de células com MN indica que, sob determinada condição de tratamento, a exposição ao agente-teste não resultou em aumento significativo de danos cromossômicos na população de células avaliadas.

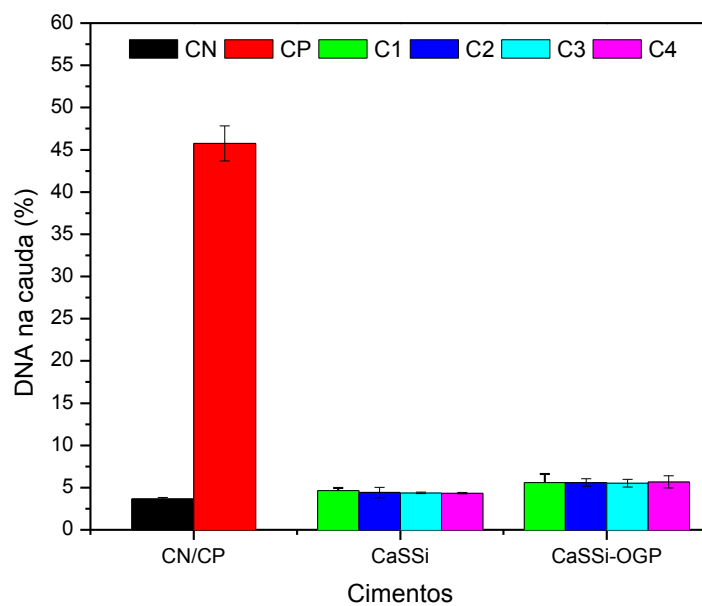
Ensaio de Genotoxicidade

Os resultados obtidos no Teste do Cometa, que avalia a genotoxicidade dos cimentos CaSSi e CaPSi, estão apresentados nas Figuras de 81 a 86.

O ensaio cometa é amplamente empregado para avaliação de dano ao DNA, por agente alquilantes, intercalantes e oxidantes, por exemplo, e reparo de células eucarióticas. Existem basicamente dois tipos de protocolos para este teste: (a) tratamento neutro, que detecta quebra de cadeia dupla no DNA; e (b) tratamento alcalino, que detecta quebras simples e duplas de cadeia, diretas ou induzidas por lesões nas bases do DNA (como oxidação), cujo procedimento transforma essas anomalias em lesões álcali-lábeis (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEIL, 1995; COLLINS et al., 2008). A realização da eletroforese em condições alcalinas, escolhida para ser realizada nesse projeto, é a versão mais abrangente desse ensaio e foi utilizada para verificar se os cimentos CaSSi e CaPSi seriam capazes de promover um comportamento genotóxico nas células CHO-K1.

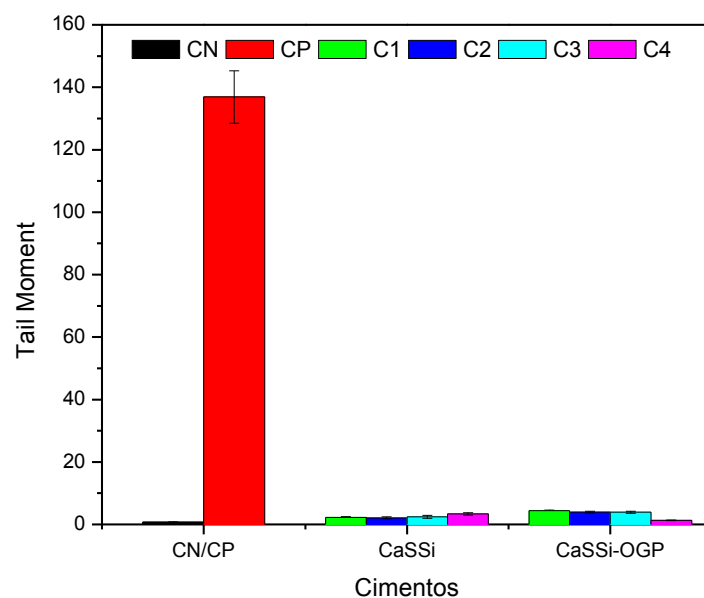
De acordo com os resultados de porcentagem de DNA na cauda, o cimento CaSSi não se mostrou genotóxico em nenhum dos tratamentos, pois não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. A análise dos valores do *Tail Moment* (Figura 82) mostra que nenhum dos tratamentos, extrato puro e diluições de ambos os cimentos foram genotóxicos ($p > 0,05$). Os resultados de IDD (Figura 83) mostraram que os valores para o Dano ao DNA ficaram entre 0 e 1, referentes a 5-20% de dano, estatisticamente diferente do controle positivo.

Figura 81. Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio cometa dos cimentos CaSSi e CaSSi-OGP. Colunas indicam o valor médio da porcentagem de DNA encontrado na cauda dos nucleóides.



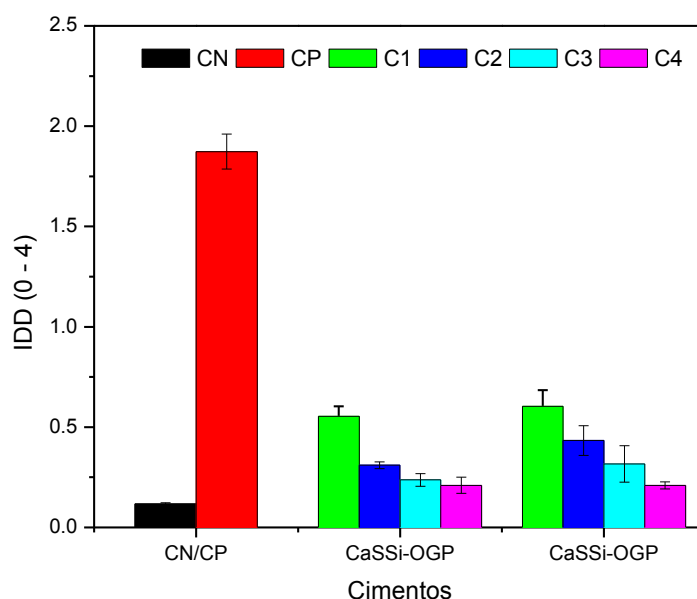
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 82. Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa. Colunas indicam o valor médio do *Tail Moment* para os cimentos CaSSi e CaSSi-OGP.



Fonte: Elaborado pela autora

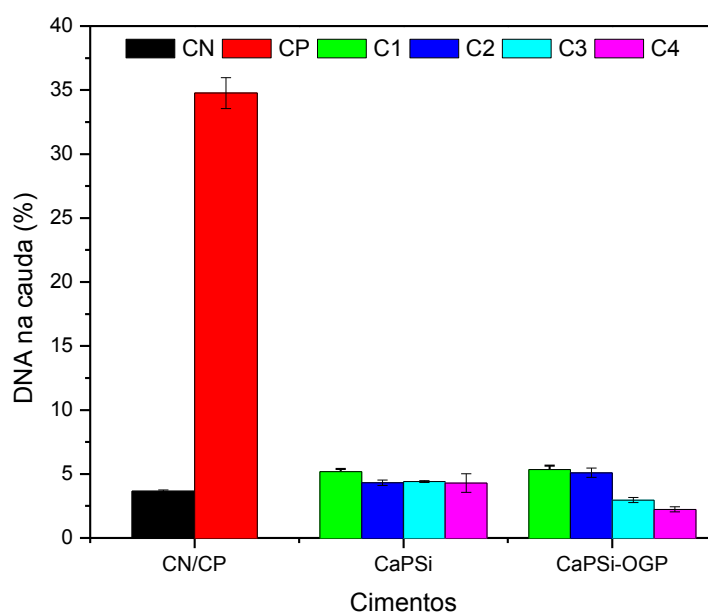
Figura 83. Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa dos materiais CaSSi e CaSSi-OGP. Colunas indicam o valor médio do Índice de Danos no DNA (IDD) por avaliação de danos dos diferentes tratamentos.



Fonte: Elaborado pela autora

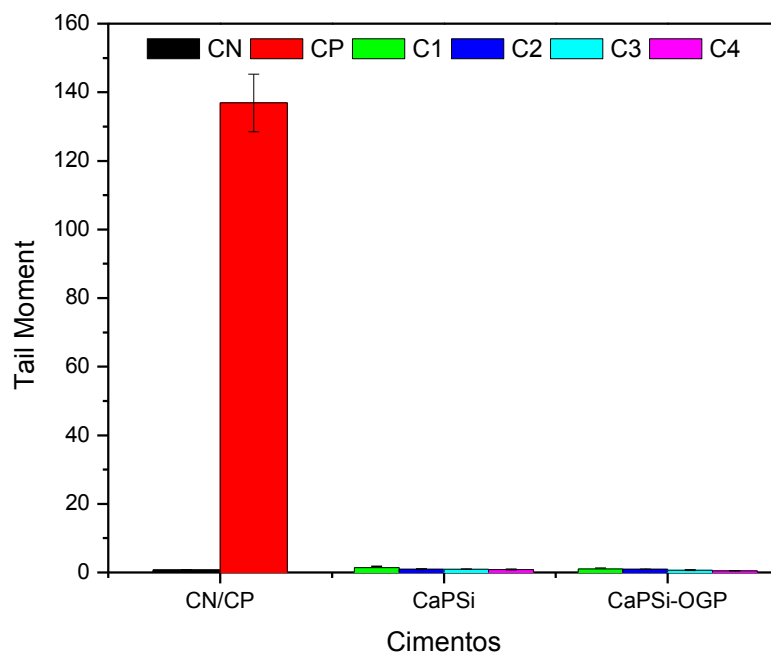
Os resultados do teste cometa dos cimentos CaPSi e CaPSi-OGP mostraram que as amostras não apresentaram nenhum nível de dano em nenhum dos tratamentos, ou seja, não mostraram diferença significativa com o controle negativo em nenhum dos parâmetros analisados ($p < 0,05$). Os resultados de IDD apresentaram-se entre 0 e 0,5, que corresponde a menos que 5% de Dano ao DNA.

Figura 84. Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio cometa dos cimentos CaPSi e CaPSi-OGP. Colunas indicam o valor médio da porcentagem de DNA encontrado na cauda dos nucleóides.



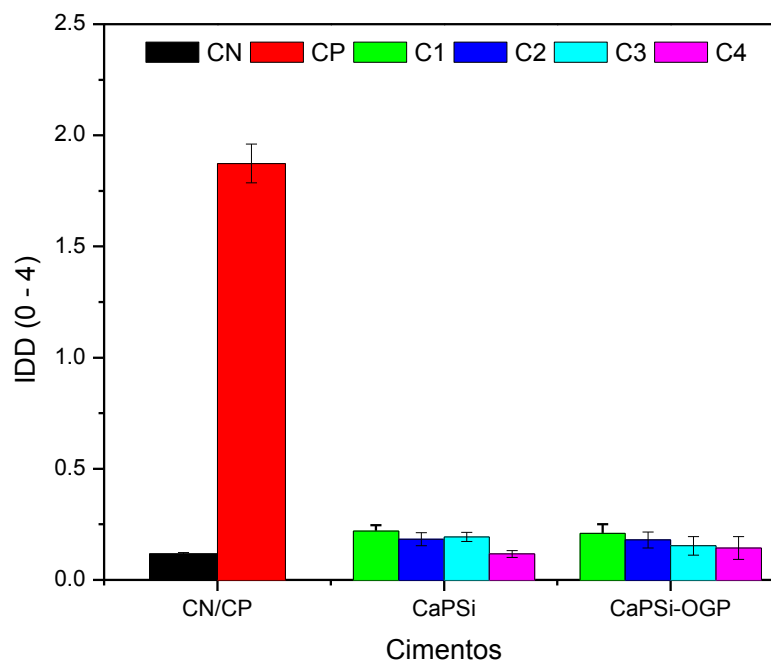
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 85. Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa. Colunas indicam o valor médio do *Tail Moment* dos cimentos CaPSi e CaPSi-OGP.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 86. Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa dos materiais CaPSi e CaPSi-OGP. Colunas indicam o valor médio do Índice de Danos no DNA (IDD) por avaliação de danos dos diferentes tratamentos.



Fonte: Elaborado pela autora

Deve-se destacar que o teste cometa não é utilizado para detectar mutações, mas lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferentes das mutações, as lesões detectadas pelo Ensaio Cometa são passíveis de correção (ALBERTINI et al., 2000).

Nos experimentos executados neste estudo para a análise da genotoxicidade pelo ensaio cometa, os cimentos analisados causaram baixos índices de danos nas células CHO-K1. Os valores foram semelhantes ao grupo controle negativo e bem abaixo dos valores encontrados nos grupo controle positivo. Esses resultados demonstram que os extratos dos cimentos analisados não exerceram atividade genotóxica.

5.5.2. Cultura Celular MC3T3-E1

Viabilidade Celular

O modelo experimental utilizado nesse trabalho para avaliar a viabilidade celular e diferenciação osteoblástica, após tratamento com extratos dos cimentos CaSs e CaPs, foi realizado com células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1, subclone 14, cujo os eventos sequenciais de aquisição do fenótipo osteoblástico maduro assemelham-se aos dos osteoblastos durante a formação do tecido ósseo in vivo (QUARLES et al., 1992).

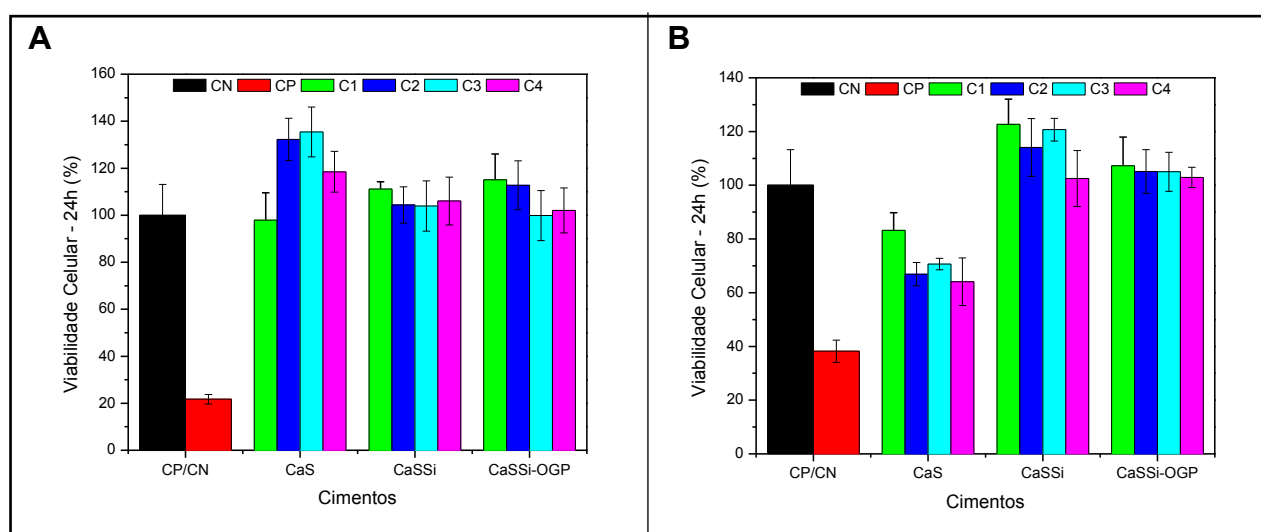
Os ensaios envolvendo as células MC3T3-E1 foram realizados seguindo os mesmos parâmetros para o preparo do meio de cultura condicionado. De acordo com os resultados dos testes com células CHO-K1, optou-se em continuar com os estudos com os cimentos CaS e CaP, com e sem sílica mesoporosa e peptídeo OGP.

A viabilidade celular após tratamento com os extratos dos cimentos foi determinada pelos testes de MTT (Figuras A) e pelo teste de exclusão do corante cristal violeta (Figuras B) que fornece dados da densidade celular, já que tem a capacidade de corar o núcleo das células.

A Figura de 87 apresenta os resultados referentes aos cimentos CaS, CaSSi e CaSSi-OGP. Em relação a esses cimentos, não houve nenhuma diferença

significativa entre os extratos testados durante as primeiras 24 horas com o CP, assim como diferença entre os cimentos sem e com partículas de sílica mesoporosa e peptídeo OGP. Pelo testes do Cristal Violeta, os tratamentos com os extratos dos cimentos CaS mostraram os menores valores de viabilidade após 24 horas, sendo que os maiores valores obtidos foram referentes aos cimentos com sílica e sílica-OGP, CaSSi e CaSSi-OGP, respectivamente, e não houve diferença entre eles.

Figura 87. Ensaio de viabilidade celular através do Teste de MTT (A) e Cristal Violeta (B) para os cimentos CaS, CaSSi e CaSSi-OGP, após 24 horas de tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 88 apresenta os resultados dos cimentos CaP, CaPSi e CaPSi-OGP. Os resultados do teste do MTT para os cimentos CaPs mostraram que somente os tratamentos com os extratos na concentração maior, no caso C1, de todas as variações apresentaram viabilidade celular diferente de CN após 24 horas, que pode estar relacionado à valores de pH baixos do meio condicionado promovidos por esses cimentos durante a cura, como mostrado na Figura 76. Os resultados obtidos pelo teste com Cristal Violeta apresentaram comportamento semelhante, onde os menores valores de viabilidade foram referentes aos C1, porém somente os tratamentos com os cimentos CaP, sem sílica, foram estatisticamente diferente do CP.

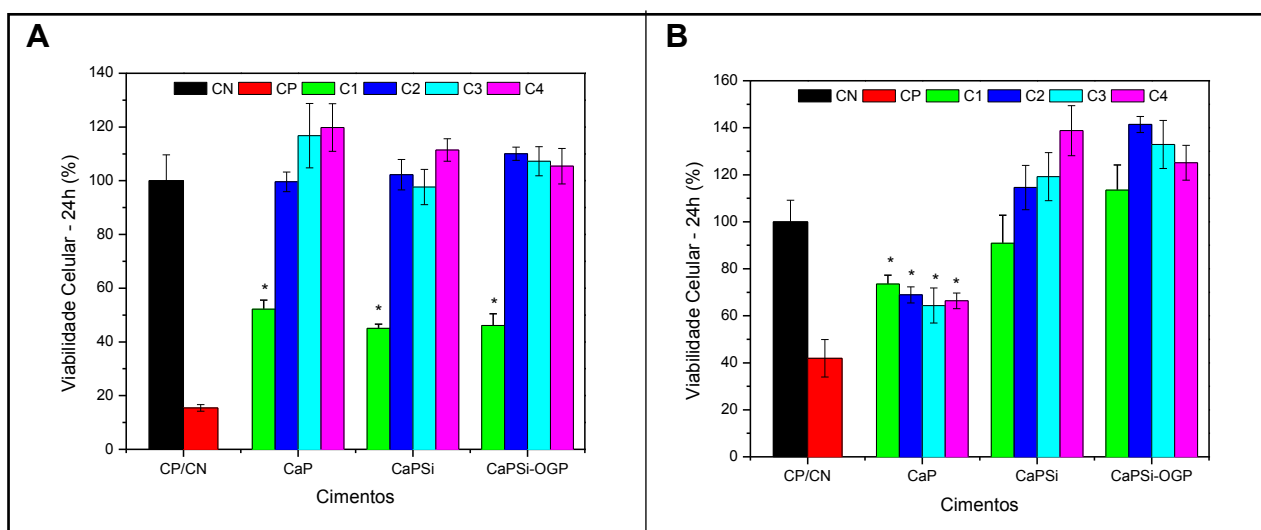
A proliferação e diferenciação das células podem estar sendo comprometidas devido ao aumento da concentração de íons livres de cálcio e fosfato, causado pela

solubilidade do cimento de DCPD, bem como alterações do pH do meio de cultura, como mostrado anteriormente. É conhecido que a bruxita promove a formação de uma solução saturada de cálcio e fosfato, seguido pela precipitação de fosfatos de cálcio menos solúveis no meio de cultura (KLAMMERT et al., 2009). Estes efeitos observados in vitro devem ser reduzidos quando in vivo, devido ao local do implante ser vascularizado.

Os resultados obtidos pela coloração com Cristal Violeta, após 24 horas em contato com os extratos dos cimentos, mostraram que os maiores valores referentes à densidade celular foram obtidos pelos cimentos com sílica, tanto para os cimentos CaSSi e CaSSi-OGP quanto para os cimentos CaPSi e CaPSi-OGP. Assim, a presença das partículas sílica mesoporosa nos cimentos parece favorecer a proliferação das células pré-osteoblásticas.

Além disso, vale destacar que nenhuma das concentrações foi estatisticamente semelhante ao controle positivo em nenhum dos tempos analisados.

Figura 88. Ensaio de viabilidade celular através do Teste de MTT (A) e Cristal Violeta (B) para os cimentos CaP, CaPSi e CaPSi-OGP, após 24 horas de tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Mineralização *in vitro*

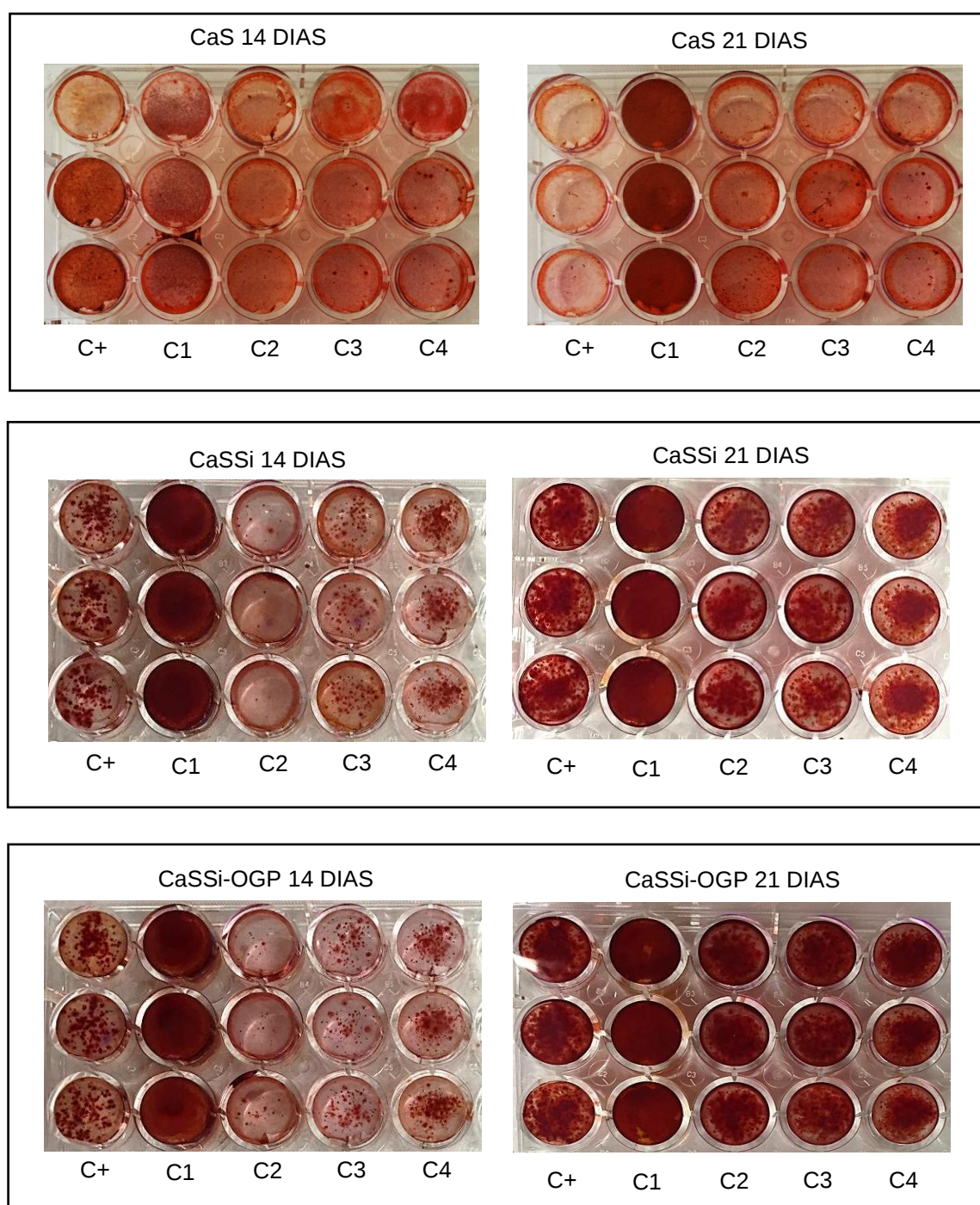
A deposição de cálcio, através das células pré-osteoblásticas tratadas com os extratos dos cimentos e coradas com vermelho de alizarina, está apresentada nas Figuras 89 e 90.

É conhecido que o crescimento dos osteoblastos pode ser dividido em três fases: fase proliferativa, 1 a 9 dias; de diferenciação osteoblástica e de síntese e maturação da matriz extracelular, 9 a 16 dias; de mineralização da matriz extracelular, 16 a 21 dias. Logo, optou-se pelos tempos de avaliação da mineralização *in vitro* em 14 e 21 dias, o que permitiu observar a resposta celular após o tratamento com os extratos dos cimentos, a influência da presença do peptídeo OGP e os tempos experimentais em duas fases distintas.

A análise qualitativa da coloração mostrou que a mineralização das células MC3T3-E1 apresentam maior deposição de cálcio após 21 dias de tratamento em relação a todas as concentrações dos extratos, tanto dos CaSs quanto dos CaPs. As imagens mostraram que em 14 dias de estudo os cimentos CaPs mostraram maior deposição de cálcio em comparação aos cimentos CaSs no mesmo período.

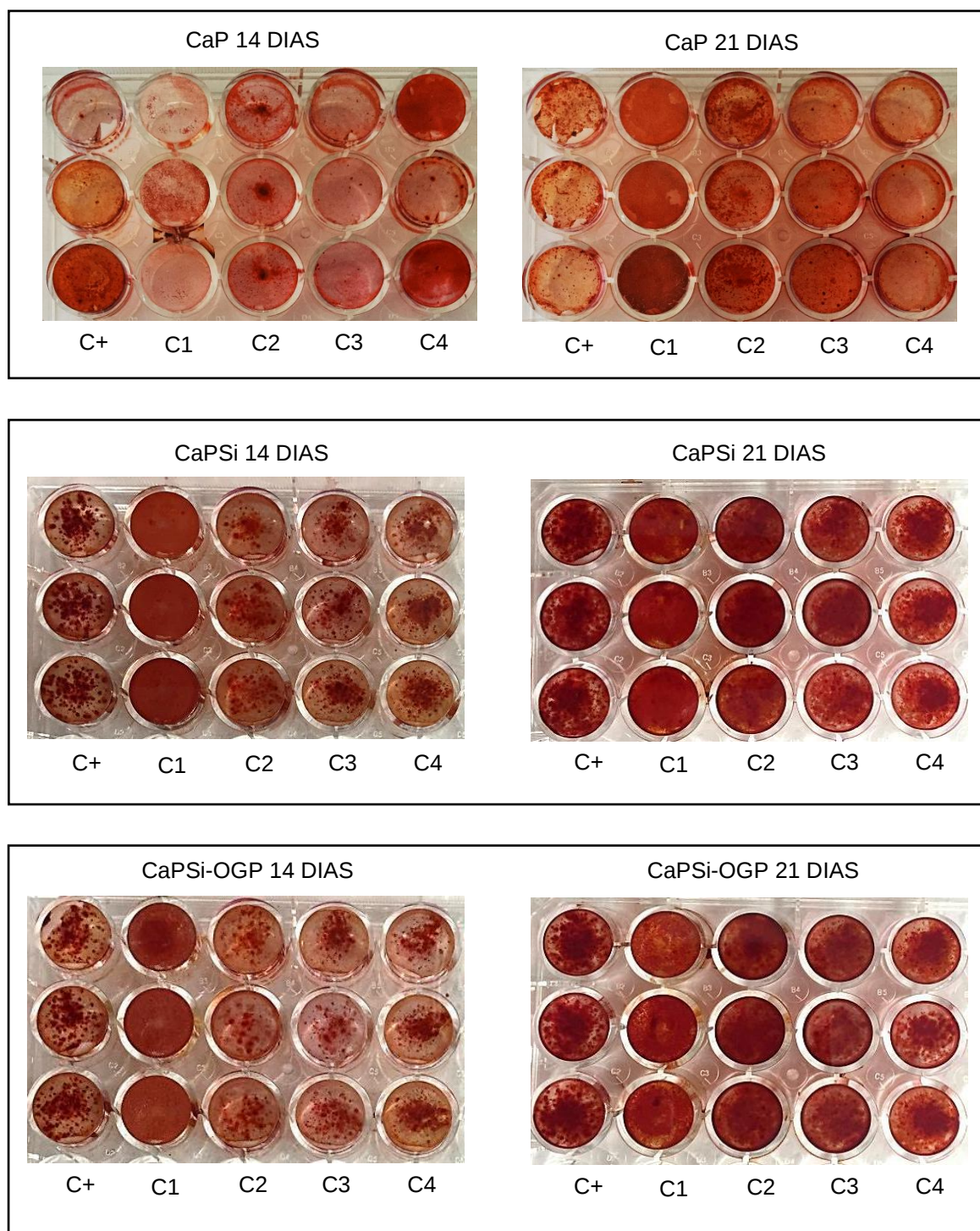
A formação da matriz mineralizada, mais especificamente de nódulos mineralizados, é utilizada para avaliar a capacidade osteogênica das culturas derivadas de células ósseas. A formação destes nódulos pode estar relacionada com o número de células e que cada nódulo surge a partir de uma única célula ou de uma unidade osteogênica formadora de colônias (GRONOWICZ; RAISZ, 1996). Vale destacar que houve diferença entre as imagens das placas de cultivo dos materiais sem e com sílica, mas não houve diferença nas imagens das placas de cultivo entre os cimentos com sílica e sílica-peptídeo OGP, demonstrando que a deposição de cálcio nesse estudo está mais relacionado à presença de sílica, do que a presença ou não do peptídeo OGP, corroborando com os resultados obtidos pela coloração com Cristal Violeta.

Figura 89. Imagens das áreas de formação de matriz calcificada observadas macroscopicamente após tratamento da cultura celular com extratos dos cimentos CaS, CaSSi e CaSSi-OGP nos períodos de 14 e 21 dias.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 90. Imagens das áreas de formação de matriz calcificada observadas macroscopicamente após tratamento da cultura celular com extratos dos cimentos CaP, CaPSi e CaPSi-OGP nos períodos de 14 e 21 dias.



Fonte: Elaborado pela autora

5.6. Análises in vivo

Para o teste com animais, optou-se em realizá-lo somente com um tipo de cimento. Como o objetivo do projeto foi desenvolver um cimento injetável e bioativo, os cimentos CaS foram descartados, pois nos testes de bioatividade in vitro utilizando solução tampão SBF não se mostraram bioativos. Além disso, o material deveria promover o mínimo de reação negativa quando testado em cultura celular. Assim, entre os grupos dos cimentos CaP e CaAl, os cimentos CaPs foram os escolhidos para serem analisados no teste in vivo.

Análise Radiográfica e Histomorfométrica

Nesse estudo, foram observados os comportamento dos cimentos CaP, CaPSi e CaPSi-OGP no preenchimento de defeitos de tamanho críticos em calvária de ratos, por avaliação de aspectos histomorfométricos do reparo ósseo, como evolução do fechamento e da área de formação óssea, bem como da densidade óssea nas margens do defeito, por comparação entre os grupos experimentais e o controle.

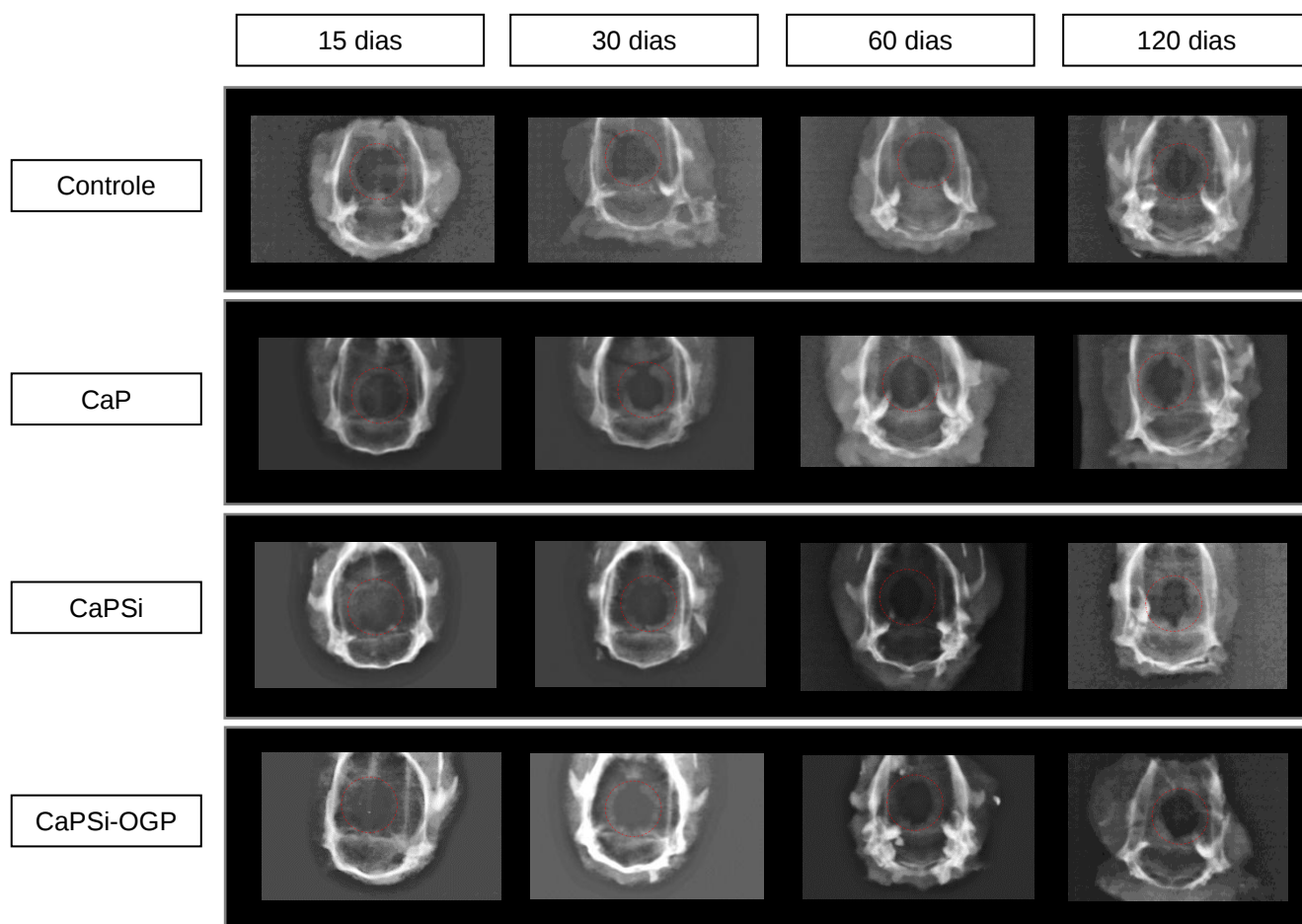
As imagens radiográficas dos referidos animais dos grupos experimentais e controle (Figura 91) foram analisadas pelo programa VinxWin, onde os valores da densidade óssea foram mensurados em escala de cinza na região das margens dos defeitos e convertidos em mmAl pela comparação com a densidade da escala de alumínio (espessura de 0,5-3,5 mm). Os valores obtidos por grupo e por período estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Densidade óssea do osso neoformado na região das margens dos defeitos dos grupos experimentais CaP, CaPSi e CaPSi-OGP e controle, segundo os períodos de análise pós-cirúrgicos. (*) representa diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$; Tukey); (a) representa diferença estatística entre os grupos experimentais.

Grupo	Períodos			
	15d	30d	60d	120d
Controle	0.337±0.03	0.409±0.02	0.450±0.02	0.763±0.04
CaP	0.463±0.01*	0.506±0.02*	0.546±0.02*	0.931±0.03*
CaPSi	0.506±0.02*	0.490±0.01	0.566±0.01*	0.840±0.03*
CaPSi-OGP	0.533±0.05*	0.565±0.08*	0.679±0.01* ^a	0.877±0.01*

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 91. Imagens radiográficas digitais dos grupos experimentais (CaP, CaPSi e CaPSi-OGP) e controle, de acordo com os períodos de análise pós-cirúrgico. O pontilhado vermelho representa aproximadamente a área onde foi realizado o defeito (8mm).



Fonte: Elaborado pela autora

Período 15 dias pós-operatório

O limite entre a cavidade cirúrgica e o osso pré-existente é facilmente identificado pela presença de duas camadas de osso cortical e medular, denominada *díploe* (Figura 92).

O tecido ósseo pré-existente apresentou áreas de remodelação e intensa formação óssea, no grupo dos animais onde o defeito foi preenchido com os cimentos. Em todos os grupos experimentais, foi observado tecido de granulação formado por leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, fibras delgadas de colágeno, fibroblastos e vasos sanguíneos, alguns em estase sanguínea, preenchendo o centro da cavidade cirúrgica. O grupo controle apresentou tecido conjuntivo frouxo em toda extensão da cavidade cirúrgica. Observou-se uma reação inflamatória de grau leve a moderado nos grupos experimentais, provavelmente relacionado ao trauma cirúrgico e à presença de material, além da presença de células gigantes adjacentes aos cimentos, o que caracteriza inflamação crônica. No grupo controle a resposta inflamatória foi caracterizada como grau muito leve, provavelmente relacionado ao trauma cirúrgico. As imagens de raios X mostram que o processo de reparação foi iniciado em todos os grupos (Tabela 14), porém a densidade óssea na margem do defeito nos grupos experimentais possuem diferença estatística em relação à mesma área no grupo controle ($p < 0,05$), sendo que o maior valor é atribuído ao grupo CaPSi-OGP.

Em relação à área de formação óssea, todos os cimentos foram melhores que o grupo controle, mas não houve diferença estatística significativa entre eles (Figura 96). Aliás, o cimento CaPSi-OGP e CaPSi, com e sem peptídeo respectivamente, apresentaram o mesmo desempenho, com extensa proliferação de vasos sanguíneos e, conseqüentemente, osso neoformado, caracterizado por matriz osteóide, onde é visível a diferença na espessura do osso imaturo. Os cimentos apresentaram maior porcentagem de fechamento do defeito, mas somente os cimentos CaPSi e CaPSi-OGP apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle (Figura 97).

Período 30 dias pós-operatório

Através da análise histológica observou-se o limite entre a cavidade cirúrgica e o osso pré-existente (área periférica do defeito), células adiposas que são características do couro cabeludo, além da presença de tecido de granulação (nos grupos experimentais), preenchendo o defeito remanescente (Figura 93). Este tecido é formado por fibras colágenas mais espessas, em relação ao período anterior; nas áreas periféricas ao defeito, áreas de formação e remodelação ósseas mais intensas nos grupos experimentais, com osso neoformado mais organizado e mineralizado. Em relação à reação inflamatória, houve redução no índice de resposta em todos os cimentos analisados em relação ao período anterior, apresentando grau leve para os grupos experimentais e inexistente ao grupo controle.

A análise histomorfométrica mostrou que todos os cimentos promoveram maior área de formação óssea, no entanto somente os grupos CaPSi e CaPSi-OGP mostraram diferença significativa em relação ao controle, onde a maior porcentagem foi atribuída ao cimento CaPSi-OGP (Figura 96), assim como o maior valor de densidade óssea (Tabela 14). Os resultados referentes ao fechamento do defeito foram semelhantes ao período de análise anterior, os cimentos mostraram melhores que o grupo controle nesse parâmetro (Figura 97). Assim como na formação óssea, o cimento CaPSi-OGP apresentou uma maior porcentagem de fechamento do defeito nesse período ($p < 0,05$).

Período 60 dias pós-operatório

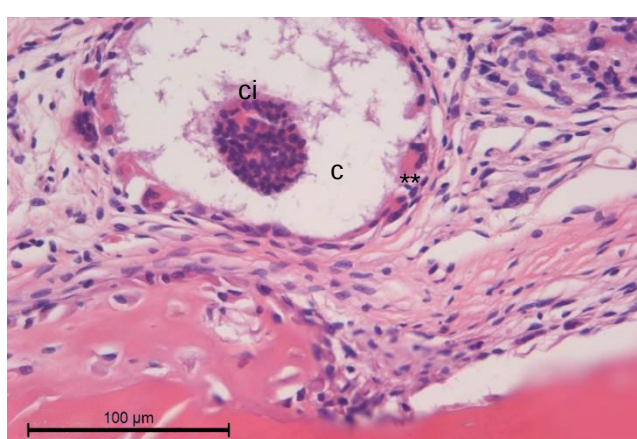
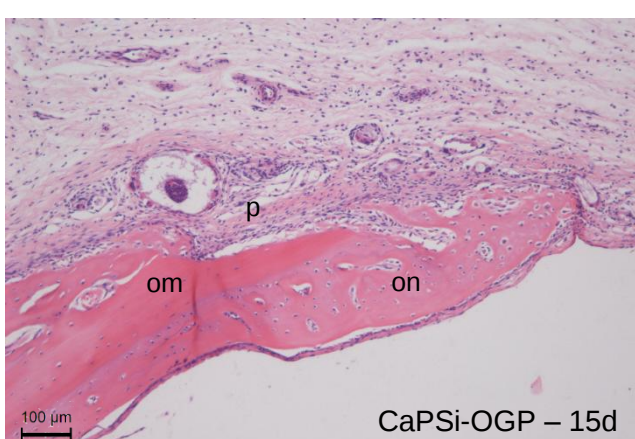
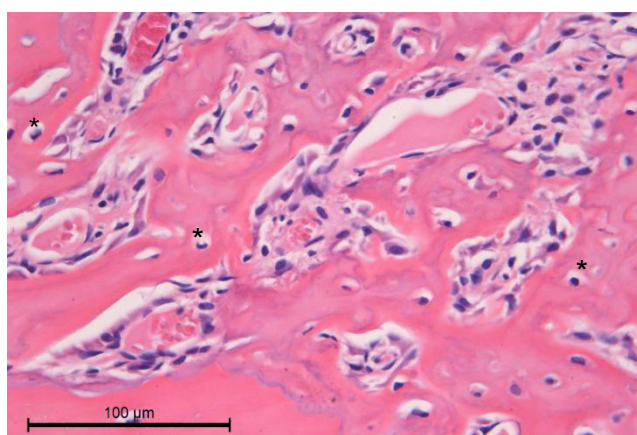
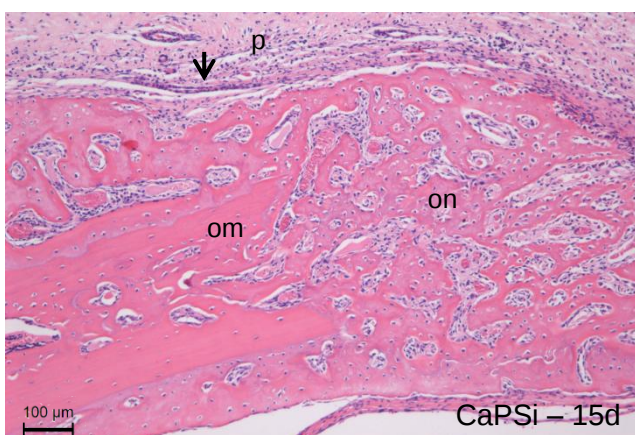
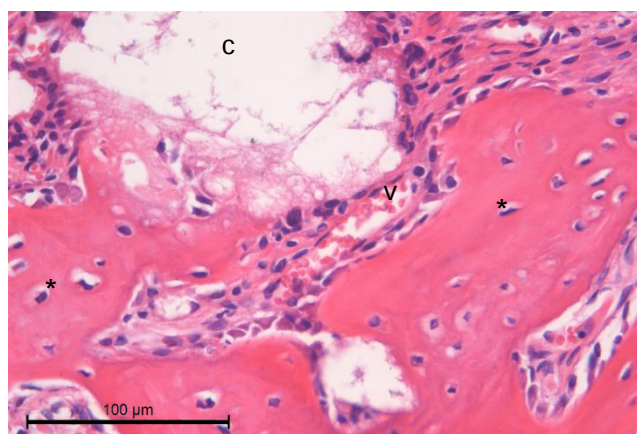
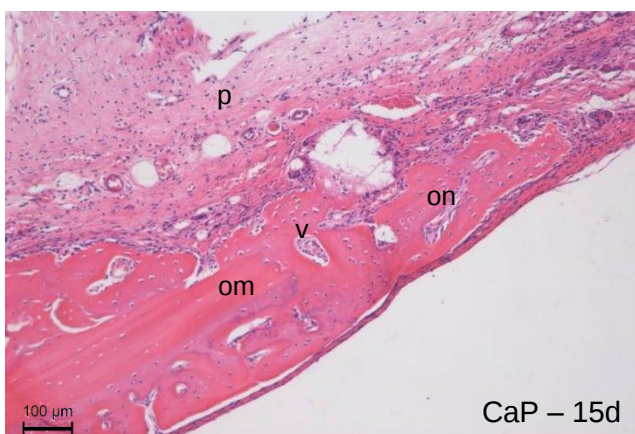
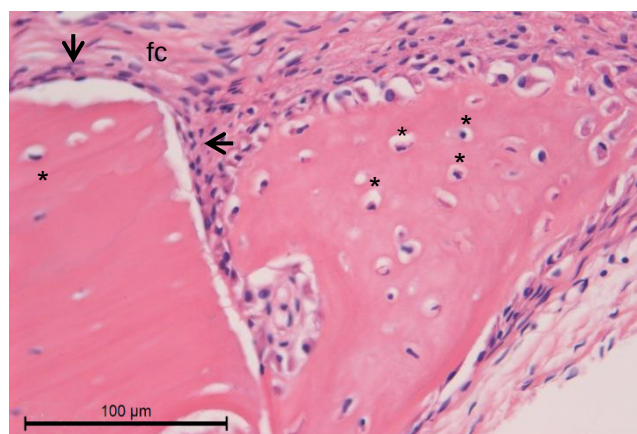
Neste período, o limite entre o defeito crítico e o osso pré-existente não era tão evidente em alguns animais dos grupos experimentais. Osso neoformado na periferia dos defeitos apresentou vários estágios de maturação nos grupos experimentais, porém os defeitos não se apresentaram totalmente reparados (Figura 94). Nesse período de análise, ainda foi possível observar que há cimentos remanescentes na cavidade cirúrgica, sendo que no caso do cimento CaP ocorreu a deposição de matriz mineralizada de forma adjacente ao material. A reação inflamatória foi menor que nos períodos de análise anteriores sendo considerada inexistente nos grupos experimentais, não mostrando diferença com o grupo controle.

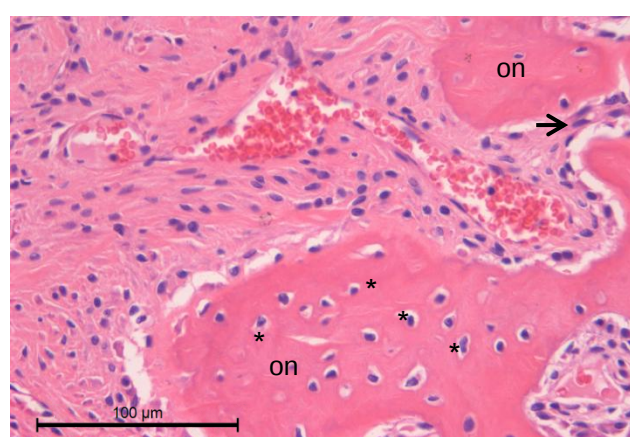
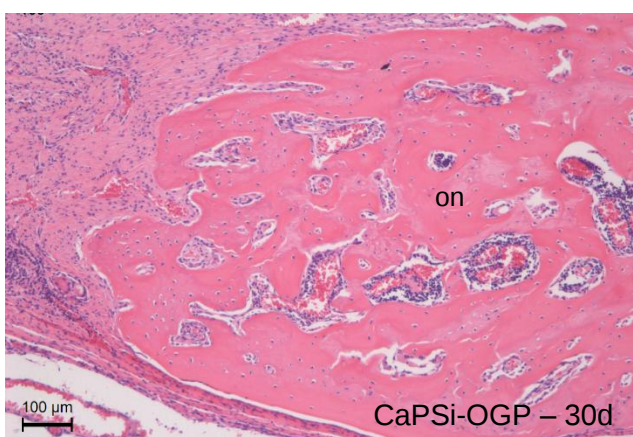
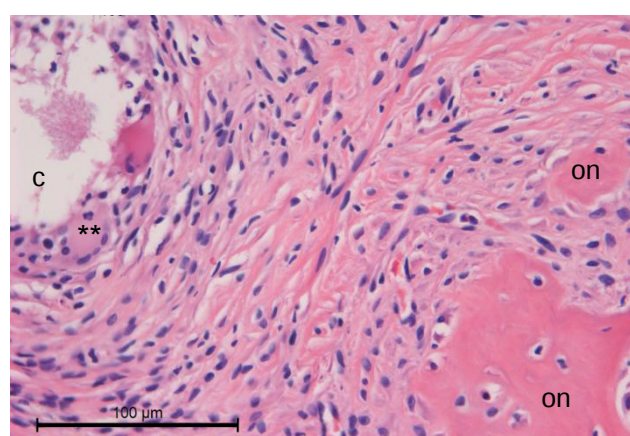
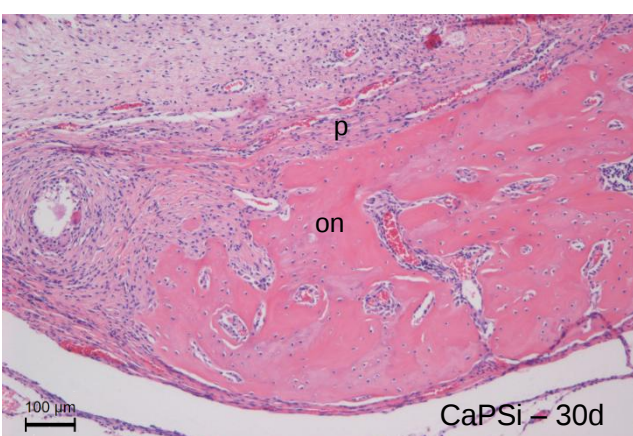
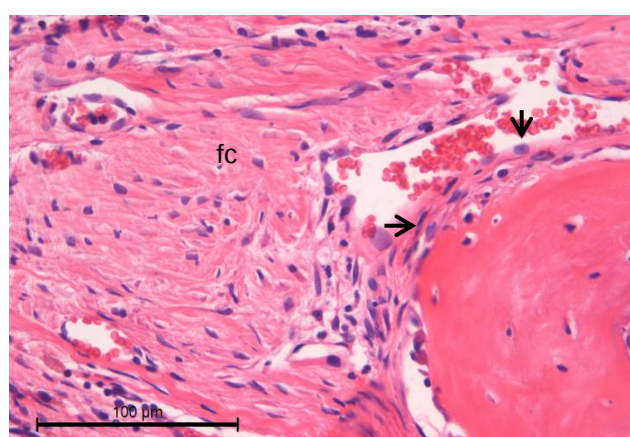
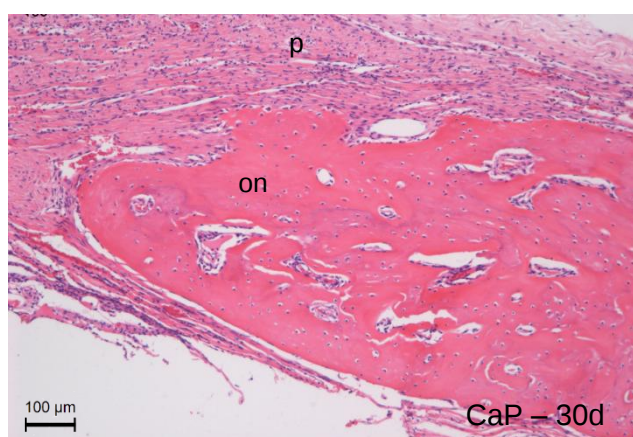
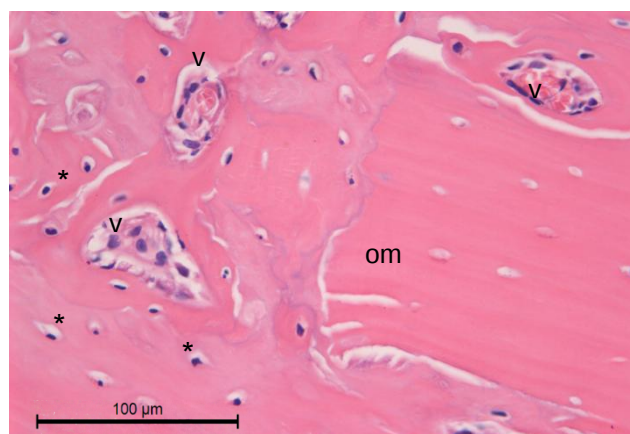
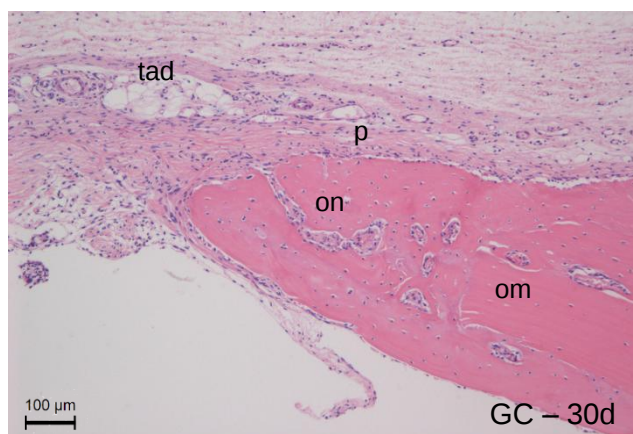
Nas análises de área de formação óssea e porcentagem de fechamento do defeito, não houve diferença significativa dos grupos experimentais em relação ao grupo controle. No entanto, os valores para esses parâmetros foram maiores para os cimentos CaPSi e CaPSi-OGP e as densidades ósseas nos grupos experimentais mostraram diferença estatística em relação ao controle, sendo que o valor atribuído ao grupo CaPSi-OGP possui diferença significativa com os demais grupos experimentais (Figura 102 e 103, $p<0,05$).

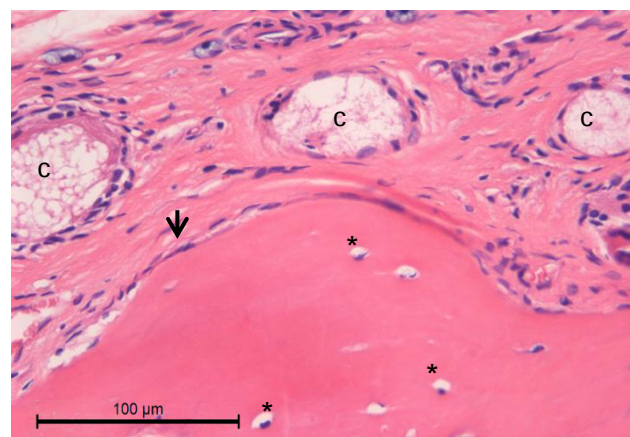
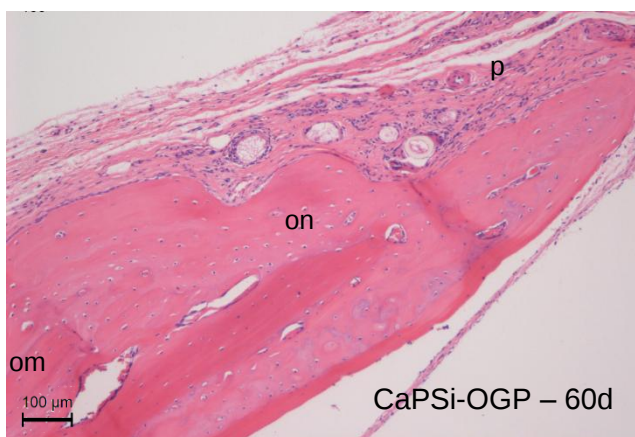
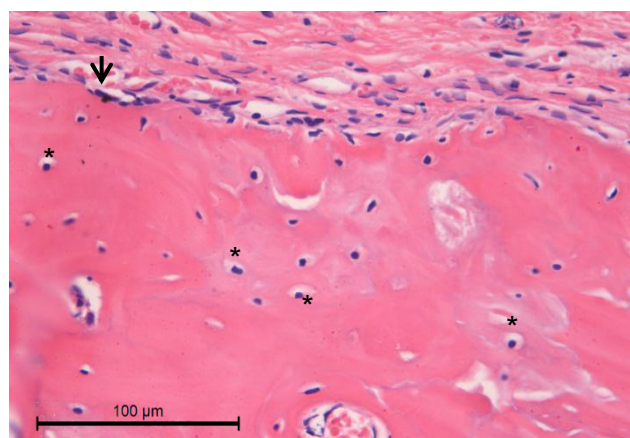
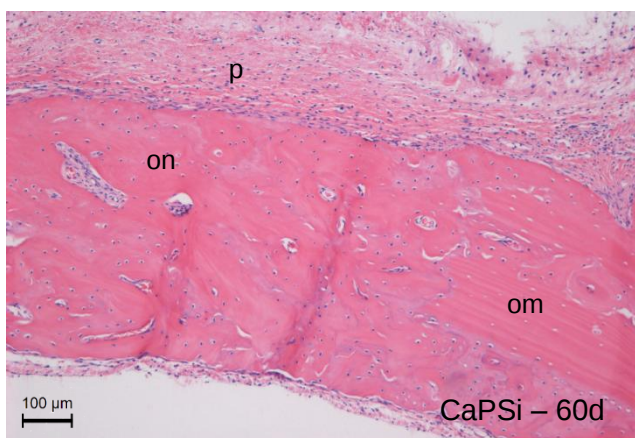
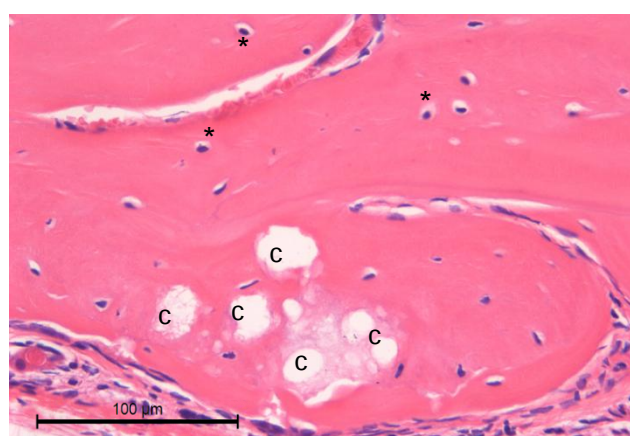
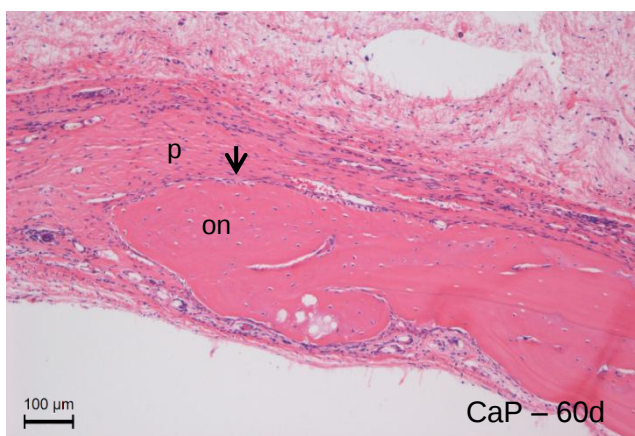
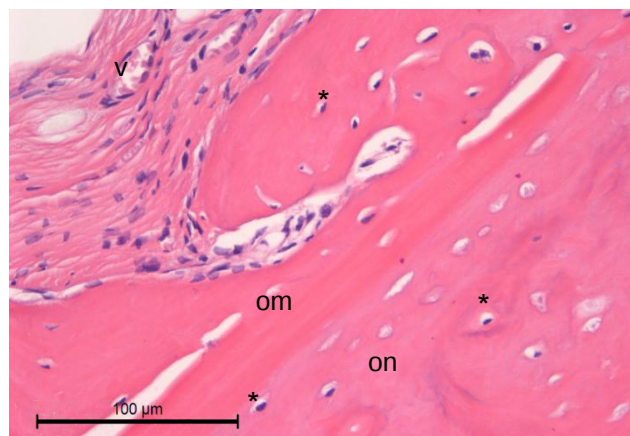
Período 120 dias pós-operatório

No último período pós-operatório analisado, observou-se que os defeitos ósseos críticos não foram totalmente reparados. No entanto, os defeitos apresentam-se com tecido ósseo maduro e áreas em diferentes estágios de maturação; observam-se inúmeros osteócitos e vasos sanguíneos demonstrando um osso saudável (Figura 95). A formação óssea que até os períodos anteriores era predominantemente da periferia para o centro, neste período soma-se a sítios ósseos na região central, próximo a sutura sagital. Nenhuma resposta inflamatória foi observada nesse período. Além disso, o grupo CaP apresentou cimento remanescente com tecido ósseo mineralizado depositado de forma adjacente.

Não houve diferença estatística entre os resultados de fechamento do defeito e área de formação óssea entre os grupos experimentais e o controle (Figura 96 e 97). Porém, nesse período as densidades ósseas dos grupos experimentais mostraram diferenças estatísticas em relação ao controle (Tabela 14, $p<0,05$).







Fonte: Elaborado pela autora

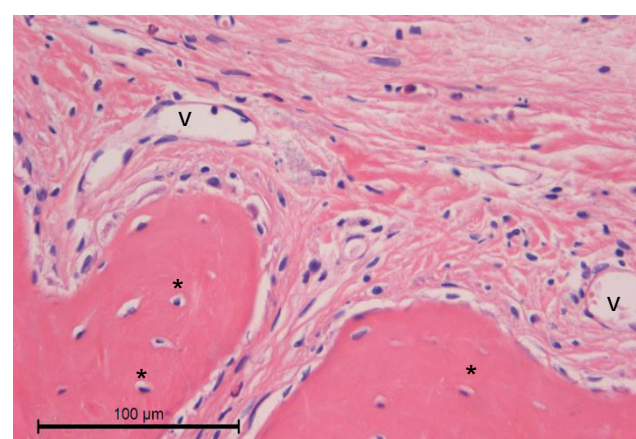
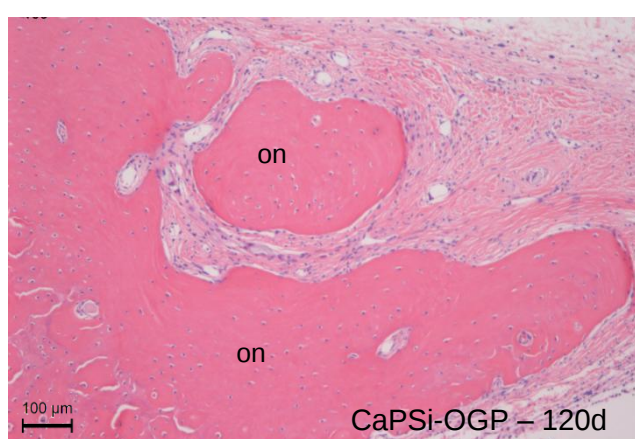
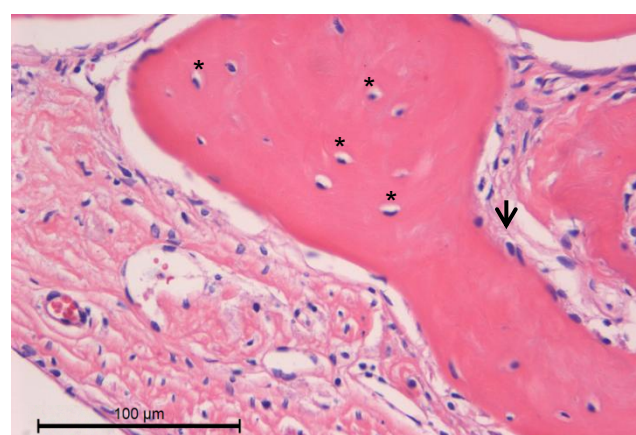
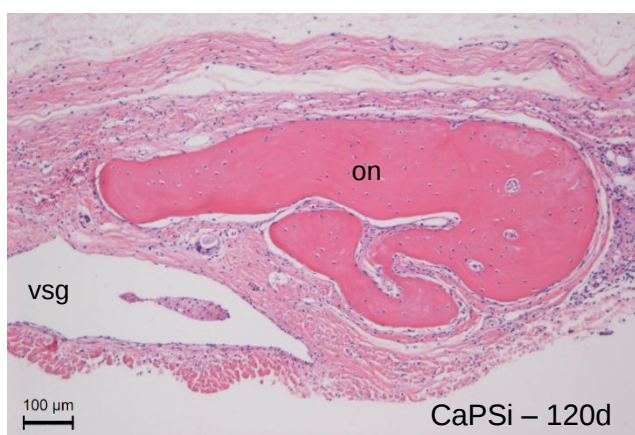
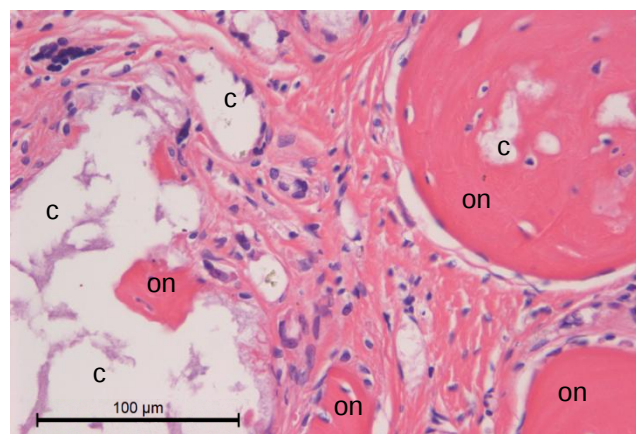
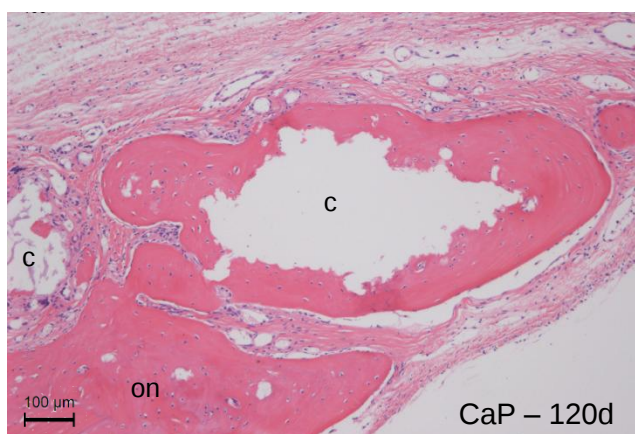
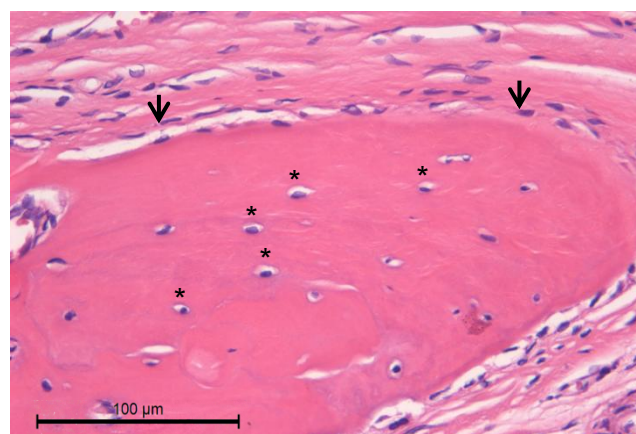
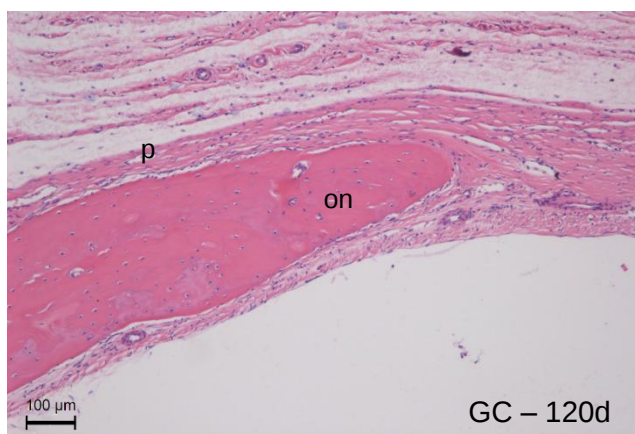
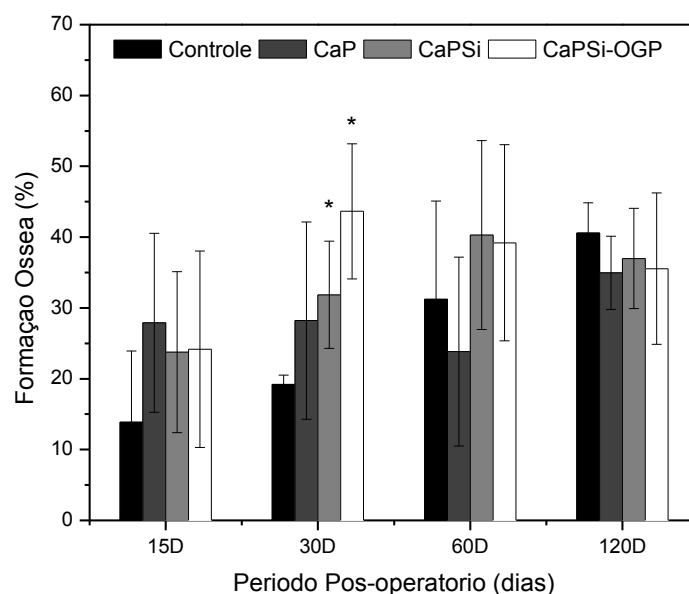
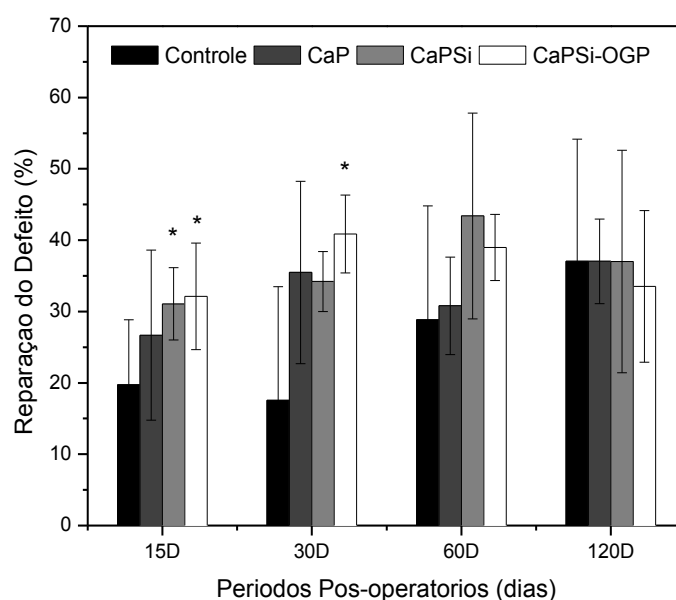


Figura 96. Área da formação óssea no defeito crítico (%) em função do tempo para os grupos experimentais (CaP, CaPSi e CaPSi-OGP) e controle. (*) representa diferença estatística em relação ao controle.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 97. Reparação do defeito ósseo crítico (%) em função do tempo para os grupos experimentais (CaP, CaPSi e CaPSi-OGP) e controle. (*) representa diferença estatística em relação ao controle.



Fonte: Elaborado pela autora

Os fosfatos de cálcio são as biocerâmicas mais estudadas porque possuem composição química semelhante a do osso. Embora o β -TCP seja muitas vezes considerado o material mais conveniente para propostas osteocondutivas, o DCPD é biocompatível, osteocondutor e reabsorve mais rapidamente permitindo uma neoformação óssea mais rápida (MARIÑO et al., 2007).

Neste trabalho, o teste in vivo avaliou a presença das partículas de sílica e peptídeo OGP em um cimento de DCPD, formado pela mistura de β -TCP e MCPM, na reparação do tecido ósseo. Durante todo o procedimento cirúrgico buscou-se realizar os procedimentos mais próximos das cirurgias ortopédicas. Assim, os cimentos foram preparados no ato cirúrgico, inseridos em uma seringa estéril e injetados no defeito ósseo, nos mesmos parâmetros utilizados nos testes de caracterização. Apesar de todos os cuidados, observou-se em alguns casos que ocorreu deslocamento dos cimentos pós-cirurgia, apesar dos mesmos estarem visualmente acomodados na cavidade cirúrgica.

Driessens e colaboradores (1998) sugeriram que o cimento deve ser injetado antes do tempo inicial de cura e o acesso cirúrgico deve ser fechado depois do tempo final de cura; entre esses dois períodos o cimento não deve sofrer deformação, pois induziria a fissuras. Desta forma, foi proposto um teste para medir o tempo de coesão, que é o tempo no qual o cimento não se desintegra após imersão em solução aquosa. Clinicamente significa que o cimento deve ser implantado após o tempo de coesão, mas antes do tempo inicial de cura, sendo que a diferença entre este e o tempo de coesão deve ser maior ou igual a um minuto (FERNANDEZ et al., 1996). Nesse estudo, o deslocamento dos cimentos nos defeitos ósseos pode ser atribuído a uma reação de cura incompleta, devido à implantação do cimento antes do tempo de coesão, e/ou fechamento do acesso cirúrgico antes do tempo final de cura, já que o CaP e CaPSi apresentaram F-ST próximo 26 e 30 minutos, respectivamente, quando imersos em solução SBF.

Uma alternativa para se tentar minimizar esse deslocamento seria a utilização de uma membrana, reabsorvível ou não, após o preenchimento do defeito ósseo (CAVALCANTE et al., 2008; PERELMAN-KARMON et al., 2012), e desta forma reduzir também as reações de corpo estranho, mas por outro lado, seria mais uma variável neste estudo.

A reabsorção do material é importante, pois deve haver liberação de espaço na área do defeito para que ocorra o crescimento ósseo (VAN de WATERING et al., 2012). No entanto, a disparidade entre a taxa de reabsorção dos cimentos nos grupos experimentais e taxa de formação óssea contrasta com estudos em ossos longos, onde a formação de osso e a reabsorção do cimento foram concomitantes (APELT et al, 2004; TSAI et al., 2008). Diferentemente de ossos longos, que possuem perióstio e endóstio, a calota craniana é revestida por perióstio, na parte externa, e por dura-máter, na parte interna. O folheto externo da dura-máter adere-se ao osso da calota e se comporta como “perióstio interno”, mas não possui capacidade osteogênica, o que dificulta a reparação de fraturas no crânio (MACHADO, 1993). Por outro lado, esse mecanismo de reparação da calota seria uma vantagem, pois a formação de um calo ósseo, característico da reparação óssea em ossos longos, poderia pressionar o cérebro, podendo causar algum dano ao tecido nervoso.

Assim, esse trabalho possibilitou a avaliação dos cimentos na reparação de defeitos críticos na calota craniana, onde deve-se considerar que a calota possui reduzida fonte de células osteoprogenitoras e não sofre carga funcional como os ossos longos, dentre eles o fêmur, e, desta forma, apresentam respostas e velocidade de reparação distintas (GOMES; FERNANDES, 2011). Ademais, como não foram utilizadas membranas como barreiras físicas, houve a proliferação de células do tecido conjuntivo para o interior do defeito, o que pode ter contribuído para uma diminuição da diferenciação das células osteoprogenitoras (CAMPOS; ROSA, 2012), assim como, a rápida reabsorção dos cimentos pode ter contribuído para esse fenômeno.

A reabsorção de cerâmicas de fosfato de cálcio ocorre através de dois mecanismos: reabsorção passiva e/ou reabsorção ativa (GINEBRA et al., 2012); a passiva é um processo mediado pela solução, onde o material se dissolve no meio fisiológico. E a ativa, é um processo mediado por células, onde ocorre fagocitose da cerâmica.

Como mostrado nos difratogramas de raios X, os produtos de cura dos CaP estudados foram bruxita e monetita (DCPD e DCPA). In vivo, o DCPD é normalmente convertido em HA ou degradado e substituído por osso (HAN et al., 2009). A transformação do DCPD para HA também foi apontado por Constantz e

seus colaboradores (1998) em um estudo com um cimento de bruxita em fêmur de coelhos, sugerindo que o ambiente com uma vascularização mais elevada, pode acelerar essa transformação.

Quando DCPD ou DCPA é transformado em HA, reações inflamatórias podem ocorrer devido ao aparecimento de leucócitos mononucleares como macrófagos, decorrentes da liberação de produtos ácidos ou à presença de partículas soltas (CONSTANTZ et al., 1998; APELT et al., 2004). A inflamação pode contribuir na degradação dos cimentos, uma vez que os macrófagos promovem uma rápida remoção/digestão de partículas de fosfato de cálcio in vivo (YU et al., 2013) e in vitro (SILVA et al., 2003), e estão envolvidos na homeostase de formação e reabsorção óssea.

De fato, observou-se um valor de pH ligeiramente reduzido durante as primeiras horas de cura dos cimentos (Figura 25). No entanto, a reação inflamatória moderada no primeiro período de análise, não pareceu inibir a formação óssea.

Os cimentos de DCPD são reabsorvidos mais rapidamente que os cimentos de HA. Assim, quando o DCPD é convertido em HA promove um comportamento mais estável ao material em condições fisiológicas. Foi observado cimento remanescente em 60 dias pós-cirúrgico para todos os cimentos, mas somente o grupo do cimento CaP possuía cimento na cavidade cirúrgica em 120 dias pós-cirúrgico, que pode ser atribuído à conversão do DCPD em HA, já que esse cimento possui taxa de degradação menor que aqueles com partículas de sílica (Figura 59) e há osso imaturo formado sobre esse cimento e sem a presença de células inflamatórias, o que caracteriza um comportamento osteocondutivo.

É interessante destacar que Grover e colaboradores (2003) relataram que 45% da perda da massa de cimento de DCPD pode ser atribuído à desintegração do cimento, em vez de dissolução. A desintegração dos cimentos pode também estar envolvida na reação inflamatória apresentada pelos cimentos testados. Isso explicaria a ausência dos cimentos CaPSi e CaPSi-OGP nos períodos de observação mais tardios, uma vez que os cimentos com sílica mostraram maior taxa de degradação quando comparados com os que não possuíam essas partículas na composição.

Acredita-se que a dissolução foi a principal forma de reabsorção dos cimentos durante o período inicial de implantação, pois alterando a estrutura do cimento, isto poderia facilitar, posteriormente, a reabsorção mediada por células.

Com o tempo, as respostas inflamatórias ao redor dos materiais implantados diminuíram em todos os grupos experimentais e os defeitos foram preenchidos por camadas de fibras de colágeno densas e parcialmente por tecido ósseo neoformado.

A avaliação da formação óssea foi confirmada através da histomorfometria. O osso neoformado foi encontrado predominantemente na margem circundante do defeito da calvária, preferencialmente, em contato com a região da dura-máter nos primeiros períodos de análise. Já em 120 dias pós-cirúrgico foi observado, além de osso neoformado nas margens, ilhas ósseas não unidas no interior do defeito somente nos espécimes dos grupos experimentais (Figura 95). As medidas histomorfométricas demonstraram que o percentual médio de fechamento do defeito preenchidos com cimento foi próximo a 30%, nos primeiros 15 dias pós-cirúrgicos, enquanto que para o controle foi de 19%, mostrando que a formação óssea foi um terço maior nos grupos experimentais do que no controle (Figura 97). Resultados semelhantes foram encontrados em defeitos críticos em calvária de coelhos preenchidos com cimento de hidroxiapatita (BoneSource[®]) somente após 45 dias pós-cirúrgico (CAVALCANTE et al., 2008), demonstrando que os cimentos de DCPD estudados nesse trabalho possuem potencial efeito osteogênico. A análise estatística da neoformação óssea revelou uma significativa diferença entre o grupo controle e os cimentos CaPSi e CaPSi-OGP em 15 dias; somente o cimento CaPSi-OGP mostrou diferença com o grupo controle em 30 dias pós-cirúrgico ($p < 0,05$). Os resultados obtidos em 120 dias pós-cirúrgico demonstram que em nenhum grupo os defeitos estavam totalmente reestabelecidos. Esse resultado corrobora com o encontrado por Kuemmerle e colaboradores (2005) que compararam o cimento de fosfato de cálcio convencional com um cimento de DCPD injetável em calvária de ovelhas, e observaram que nenhum dos cimentos foram capazes de reconstruir defeitos considerados de tamanho crítico.

Em relação à área de formação óssea, os grupos experimentais e o controle se mostraram semelhantes nos primeiros 15 dias de observação pós-cirúrgico (Figura 96). Todos os cimentos promoveram maior formação óssea em 30 dias pós-cirúrgico, mas somente os cimentos CaPSi e CaPSi-OGP foram estatisticamente

diferentes em comparação ao controle ($p < 0,05$). No entanto, o grupo coágulo foi o único que apresentou um aumento estatisticamente significativo em relação à quantidade de osso durante os todos os períodos de observação e o cimento CaPSi até 60 dias pós-cirúrgico ($p < 0,05$).

Através das imagens radiográficas foi possível observar que todos os grupos estavam em processo de reparação tecidual (Tabela 14). Entretanto, os resultados relativos à densidade óssea equivalente ao mmAl mostraram que os cimentos promoveram a formação de osso com maior densidade na margem do defeito em comparação ao grupo controle em todos os períodos de análise. Os maiores valores de densidade obtidos foram atribuídos ao grupo CaPSi-OGP até 60 dias pós-cirúrgico, o que sugere que o peptídeo OGP pode estar envolvido não somente na formação óssea, mas também na maturação do tecido neoformado nos primeiros períodos de análise. Em 120 dias pós-cirúrgico houve aumento da densidade óssea de todos os grupos, sendo que os valores das densidades nos grupos experimentais foram estatisticamente diferentes ao controle, mas não diferiram entre si ($p < 0,05$).

Por definição, a substituição de um biomaterial ósseo reabsorvível por tecido neoformado é dependente do tempo pós-implantação. Porém, quando cimentos de hidroxiapatita ou DCPD são avaliados em estudos em animais, as mudanças histológicas mais relevantes ocorrem nas primeiras oito semanas pós-cirúrgico (CONSTANTZ et al., 1998). Frayssinet e colaboradores (1998) observaram que em oito semanas, após a implantação de cimento de DCPD em côndilo de fêmur de coelhos, as reações celulares diminuíram rapidamente. A redução na formação óssea após esse período em todos os cimentos estudados sugere que, após 60 dias pós-cirúrgico, não há aumento no fechamento do defeito, mas sim na taxa de maturação óssea (KURASHINA et al., 1995; GUIMARÃES et al., 2011), comprovado pelos resultados de densidade óssea. Desta forma, para os casos onde o objetivo é promover uma osteogênese prematura, como em casos de enxertia pré-implantes dentários, os cimentos estudados poderiam ser uma alternativa, pois oferecem uma neoformação óssea relativamente rápida com a reabsorção do material.

Embora estudos mostram que o OGP em solução, administrado por via intravenosa, têm mostrado resultados promissores no aumento da indução osteoblástica (GABET et al., 2004), na maioria das aplicações em medicina regenerativa o uso dessa molécula imobilizada é mais apropriado. Essa forma de

apresentação permite a presença do peptídeo no sítio de reparação por períodos de tempos maiores (POLICASTRO; BECKER, 2015).

Os resultados demonstraram que as análises de formação óssea e fechamento do defeito, a presença do peptídeo OGP só foi diferencial nos primeiros 30 dias pós-cirúrgicos. Provavelmente o peptídeo foi liberado na calvária concomitantemente ao processo de reabsorção, o que permitiu que o OGP estivesse disponível no local do defeito e promovesse a indução dos osteoblastos e, conseqüentemente, a formação do tecido. Diferenças significativas foram observadas no período de 30 dias após o preenchimento do defeito com o cimento CaPSi-OGP, sugerindo que a taxa de liberação maior durante as primeiras 24 horas (Figura 72) não seja interessante para o peptídeo OGP ou talvez a quantidade de peptídeo imobilizado nas partículas de sílica mesoporosa, estabelecido segundo a quantidade utilizada em aplicações intravenosas, não tenha sido suficiente para promover uma resposta diferencial em relação ao controle.

Estudos mostraram que a presença de peptídeo OGP imobilizado na superfície de biomateriais promoveu o aumento da proliferação de células mesenquimais em 7 dias, cessando em 14 dias (PANSERI et al., 2014; POLINI et al., 2014). Em calotas de camundongo, o peptídeo OGP imobilizado em membranas de celulose bacteriana promoveu a modulação da expressão de genes relacionados à diferenciação/ativação dos osteoblastos em até 15 dias pós-operatório (PIGOSSI et al., 2015). Nos períodos tardios de análise (60 e 90 dias) não se observou vantagem na incorporação desse peptídeo ao reparo ósseo. Esses resultados indicam que provavelmente as células expostas a esse peptídeo iniciam a diferenciação em estágios prévios em comparação àquelas não expostas e/ou há uma curta biodisponibilidade destes peptídeos no microambiente do defeito ósseo.

Além do mais, parece que o aumento da proliferação e diferenciação das células ocorre somente quando a extremidade C-terminal desse peptídeo, que corresponde ao OGP[10-14], está exposto, ou seja, mesmo que ele seja liberado para o local de reparação, deve haver a ativação dessa molécula via proteólise do pentapeptídeo OGP[10-14] para, então, ocorrer a sinalização celular e promover a atividade mitogênica de células osteoblásticas (GABARIN et al., 2001).

Mesmo com a alta taxa de reabsorção, os cimentos DCPD promovem a formação óssea mais rápida em comparação com cimentos de HA (HAN et al.,

2009). Quando esses cimentos são reabsorvidos, íons cálcio e fosfato são liberados. A alta concentração extracelular de íons cálcio atua como um sinal quimiotático e proliferativo para os osteoblastos e estimula a diferenciação (NAKADE et al., 2001; OBRANT et al., 2005), o que sugere que o cálcio é responsável pela sinalização e ativação de respostas específicas, como reabsorção e formação óssea (MARIE, 2010). O fosfato inorgânico também exerce algumas funções, como a indução de expressão de osteopontina, e em altas concentrações, apoptose de células osteoblásticas (BRAN et al., 2008). Em baixas concentrações pode atuar como molécula sinalizadora do início da mineralização, através do aumento da produção local de fatores de crescimento (como TGF- β) e de prostaglandina E₂ (LOSSDORFER et al., 2004). Isto pode explicar porque a atividade osteoblástica parece ser maior nos animais dos grupos experimentais, onde os cimentos promoveram a formação de tecido novo em direção ao centro do defeito, como também promoveu a formação de osso mais espesso e mais denso.

A possibilidade de íons em desencadear respostas no tecido ósseo abre um novo caminho no campo da regeneração óssea. Assim, o uso de materiais com a capacidade de distribuir localmente íons específicos pode ser importante na neoformação óssea, com vantagens adicionais, como a utilização de moléculas biologicamente ativas.

6. CONCLUSÕES

Os cimentos biocerâmicos de sulfato de cálcio, fosfato de cálcio e aluminato de cálcio, com ou sem sílica mesoporosa e peptídeo OGP foram desenvolvidos e caracterizados.

As caracterizações mostraram que a presença de partículas de sílica mesoporosa na composição promoveu diferentes comportamentos físico-químicos quando comparados com os cimentos sem sílica, como maior razão L/P, maior porosidade e menor resistência mecânica.

Os cimentos CaPs e CaAls mostraram bioatividade *in vitro* quando imersos em solução SBF, através da precipitação de uma camada de apatita na sua superfície.

O peptídeo OGP foi obtido pela síntese em fase sólida e a utilização da 5,6-carboxifluoresceína como marcador fluorescente foi eficiente e a Espectroscopia de Fluorescência se apresentou sensível para o monitoramento da liberação em SBF. A análise da liberação deste peptídeo a partir dos cimentos mostrou que a taxa de degradação do material influencia no perfil de liberação dessa molécula. Dentre os cimentos estudados, o CaSSi apresentou taxa de degradação maior e, conseqüentemente, maior velocidade de liberação do conteúdo peptídico em 24 horas.

Em relação à análise *in vitro*, os cimentos CaSs não foram citotóxicos, mas os cimentos CaP e CaAl, apresentaram menores valores para viabilidade celular em seus extratos mais concentrados, apesar que esse comportamento não comprometeu a capacidade reprodutiva. Nos ensaios de avaliação da mutagenicidade, os cimentos não promoveram dano celular significativo. Os testes envolvendo células MC3T3-E1 mostraram que a viabilidade celular e a capacidade de formação da matriz mineralizada é independente da presença do peptídeo OGP, sendo mais sensível à presença de sílica e à concentração do extrato.

O teste *in vivo* foi realizado utilizando defeitos de tamanho crítico em calotas de ratos como modelo experimental. A análise dos defeitos preenchidos com os cimentos CaP, com e sem sílica mesoporosa e peptídeo OGP, mostraram que eles se degradaram e promoveram maior formação óssea durante os primeiros 15 dias

pós-cirúrgico, assim como maior densidade nas margens dos defeitos quando comparados ao controle. No entanto, a presença do peptídeo OGP foi significativa somente nos primeiros 30 dias de análise e não houve diferença com o grupo com sílica sem peptídeo. Após esse período não houve diferença na reparação óssea entre os grupos experimentais e o controle.

Desta forma pode-se concluir que os cimentos com partículas de sílica mesoporosa e peptídeo OGP são os mais promissores para o reparo do tecido ósseo, principalmente nos períodos iniciais de cicatrização, devido ao seu maior potencial osteogênico em relação aos demais cimentos estudados.

7. PERSPECTIVAS

Como proposta para estudos futuros utilizando os sistemas desenvolvidos neste trabalho, pode-se citar:

- Avaliar esse cimentos em outros modelos cirúrgicos experimentais;
- Realizar um estudo mais aprofundado sobre o peptídeo OGP: determinar a quantidade que deve ser liberada por um biomaterial para que ocorra diferenciação osteoblástica e quais as vias de sinalização estão envolvidas.
- Avaliar in vitro e in vivo o sistema sílica mesoporosa-OGP em cimentos de fosfato de cálcio mais estáveis em meio fisiológico e com pH de cura próximo à neutralidade.

REFERÊNCIAS

- ABERG, J.; PANKOTAI, E.; BILLSTRÖM, G. H.; WESZL, M.; LARSSON, S.; FORSTER-HORVÁTH, C.; LACZA, Z.; ENGQVIST, H. In vivo evaluation of an injectable premixed radiopaque calcium phosphate cement. **International Journal of Biomaterials**, 2011. doi:10.1155/2011/232574.
- AGUILAR, F. G.; GARCIA, L. F. R.; PIRES-de-SOUZA, F. C. P. Biocompatibility of new calcium aluminate cement (EndoBinder). **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 3, p. 367-371, 2012.
- ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E. G.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.
- ALGE, D. L.; GOEBEL, W. S.; CHU, T.-M. G. In vitro degradations and cytocompatibility of dicalcium phosphate dehydrate cements prepared using the monocalcium phosphate monohydrate/hydroxyapatite system reveals rapid conversion to HA as a key mechanism. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B**, v. 100B, n. 3, p. 595-602, 2012.
- ALT, C.; WONG, L.; PARR, C. Measuring castable rheology by exothermic profile. **Refractories Applications and News**, v. 81, p. 15-18, 2003.
- AMBARD, A.; MUENINGHOFF, L. Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties. **Journal of Prosthodontics**, v. 15, p. 321-328, 2006.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM C20**: standard test methods for apparent porosity, water absorption, apparent specific gravity, and bulk density of burned refractory brick and shapes by boiling water. West Conshohocken, 2010a. 3 p.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM F981-04**: practice for assessment of compatibility of biomaterials for surgical implants with respect to effect of materials on muscle and bone. West Conshohocken, 2010b. 5 p.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM C187-11**: standard test method for normal consistency of hydraulic cement. West Conshohocken, 2011. 3 p.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM F451-12**: standard specification for acrylic bone cement. West Conshohocken, 2012. 11 p.
- ANDELIN, W. E.; SHABAHANG, S.; WRIGHT, K.; TORABINEJAD, M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. **Journal of Endodontics**, v. 29, p. 646-650, 2003.

- ANDERSSON, J.; AREVA, S.; SPLIETHOFF, B.; LINDÉN, M. Sol-gel synthesis of a multifunctional, hierarchically porous silica/apatite composite. **Biomaterials**, v. 26, p. 6827-6835, 2005.
- ANDRADE, T. L.; SANTOS, G. L.; PANDOLFELLI, V. C.; OLIVEIRA, I. R. Otimização da síntese das fases de cimento de aluminato de cálcio para fins biomédicos. **Cerâmica**, v. 60, p. 88-95, 2014.
- ANDREANA, S.; CORNELINI, R.; EDSBERG, L. E.; NATIELLA, J. R. Maxillary sinus elevation for implant placement using calcium sulfate with and without DFDBA: six cases. **Implant Dentistry**, v. 13, p. 270-277, 2004.
- ANSON D. Calcium sulfate: a four-year observation of its use as a resorbable barrier in guided tissue regeneration of periodontal defects. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 17, p. 895-899, 1996.
- APELT, D.; THEISS, F.; EL-WARRAK, A. O.; ZLINSZKY, K.; BETTSCHART-WOLFISBERGER, R.; BOHNER, M.; MATTER, S.; AUER, J. A.; VON RECHENBERG, B. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. **Biomaterials**, v. 25, n. 7/8, p. 1439-1451, 2004.
- ARAL, A.; YALÇIN, S.; KARABUDA, Z. C.; ANIL, A.; JANSEN, J. A.; MUTLU, Z. Injectable calcium phosphate cement as a graft material for maxillary sinus augmentation: an experimental pilot study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, n. 6, p. 612-617, 2008.
- ARCOS, D.; VALLET-REGÍ, M. Bioceramics for drug delivery. **Acta Materialia**, v. 61, n. 3, p. 890-911, 2013.
- ARCOS, D.; CLAVEL-SAINZ, M.; RAGEL, C. V.; MESEGUER-OLMO, L.; VALLET-REGÍ, M. (Madrid). **Metodo para la obtención de implantes bioactivos útiles como sistemas de liberación controlada**. WO 2002102430, 14 jun. 2001, 27 dez. 2002.
- ARCOS, D.; LÓPEZ-NORIEGA, A.; RUIZ-HERNÁNDEZ, E.; TERASAKI, O.; VALLET-REGÍ, M. Ordered mesoporous microspheres for bone grafting and drug delivery. **Chemistry of Materials**, v. 22, p. 1000-1009, 2009.
- ASGARY, S.; SHAHABI, S.; JAFARZADEH, T.; AMINI, S.; KHEIRICH, S. The properties of a new endodontic material. **Journal of Endodontics**, v. 34, p. 990-993, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CIMENTO PORTLAND. **Guia básico de utilização do cimento Portland**. 7. ed. São Paulo: ABCP, 2002. 28 p.
- BAB, I.; CHOREV, M. Osteogenic growth peptide: from concept to drug design. **Biopolymers**, v. 66, p. 33-48, 2002.

BAB, I.; GAZIT, D.; MASSARAWA, A.; SELA, J. Removal of tibial marrow induces increased formation of bone and cartilage in rat mandibular condyle. **Calcified Tissue International**, v. 37, n. 5, p. 551-555, 1985.

BAB, I.; GAZIT, D.; MUHLRAD, A.; SHTEYER, A. Regenerating bone marrow produces a potent growth-promoting activity to osteogenic cells. **Endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 345-352, 1988.

BAB, I.; GAZIT, D.; CHOREV, M.; MUHLRAD, A. S.; SHTEYER, A.; GREENBERG, Z.; NAMDAR, M.; KAHN, A. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. **EMBO Journal**, v. 11, p. 1867-1873, 1992.

BAB, I.; GAVISH, H.; NAMDAR-ATTAR, M.; GREENBERG, Z.; CHEN, Y.; MANSUR, N.; SHTEYER, A.; CHOREV, M. Isolation of mitogenically active C-terminal truncated pentapeptide of osteogenic growth peptide from human plasma and culture medium of murine osteoblastic cells. **Journal of Peptide Research**, v. 54, n. 5, p. 408-414, 1999.

BARRALET, J. E.; GROVER, L. M.; GBURECK, U. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part II: hypodermic injection and strength improvement of brushite cement. **Biomaterials**, v. 25, p. 2197-2203, 2004.

BECK, J. S.; VARTULI, J. C. Recent advances in the synthesis, characterization and applications of mesoporous molecular sieves. **Current Opinion in Solid State Materials Science**, v. 1, p. 76-87, 1996.

BECK, J. S.; VARTULI, J. C.; ROTH, W. J.; LEONOWICZ, M. E.; KRESGE, C. T.; SCHMIT, K. D.; CHU, C. T. W.; OLSON, D. H.; SHEPPARD, E. W.; McCULLEN, S. B.; HIGGINS, J. B.; SCHLENKER, J. L. A new family of mesoporous molecular-sieves prepared with liquid-crystal templates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 10834-10843, 1992.

BENOIT, M. A.; MOUSSET B.; DELLOYE, C.; BOUILLET, R.; GILLARD, J. Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections. **International Orthopaedics**, v. 21, p. 403-408, 1997.

BER, B. S.; HATTON, J. F.; STEWART G. P. Chemical modification of Proroot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. **Journal of Endodontics**, v. 33, p. 1231-1234, 2007.

BHARALI, D. J.; KLEJBOR, I.; STACHOWIAK, E. K.; DUTTA, P.; ROY, I.; KAUR, N.; BERGEY, E. J.; PRASAD, P. N.; STACHOWIAK, M. K. Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 32, p. 11539-11544, 2005.

BLAHA, J. D. Calcium sulfate bone-void filler. **Orthopedics**, v. 21, p. 1017-1019, 1998.

BOHNER, M.; BAROUD, G. Injectability of a calcium phosphate pastes. **Biomaterials**, v. 26, p. 1553-1563, 2005.

BOHNER, M.; MERKLE, H. P.; LEMAITRE, J. In vitro aging of a calcium phosphate cement. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 11, p. 155-162, 2000.

BOHNER, M.; VAN LANDUYT, P.; MERKLE, H. P.; LEMAITRE, J. Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, p. 675-681, 1997a.

BOHNER, M.; LEMAITRE, P.; VANLANDUYT, P. Y.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 5, p. 565-572, 1997b.

BOHNER, M.; THEISS, F.; APELT, D.; HIRSIGER, W.; HOURIET, R.; RIZZOLI, G.; GNOS, E.; FREI, C.; AUER, J. A.; VON RECHENBERG, B. Compositional changes of a dicalcium phosphate dehydrate cement after implantation in sheep. **Biomaterials**, v. 24, p. 3463-3474, 2003.

BRAGER, M. A.; PATTERSON, M. J.; CONNOLLY, J. F.; NEVO, Z. Osteogenic growth peptide normally stimulated by blood loss and marrow ablation has local and systemic effects on fracture healing in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 18, n. 1, p. 133-139, 2000.

BRAN, G. M.; STERN-STRAETER, J.; HORMANN, K.; RIEDEL, F.; GOESSLER, U. R. Apoptosis in bone for tissue engineering. **Archives of Medical Research**, v. 39, n. 5, p. 467-482, 2008.

BROEKHOFF, J. C. P.; DE BOER, J. H. Studies on pore systems in catalysts XIII. Pore distributions from the desorption branch of a nitrogen sorption isotherm in the case of cylindrical pores B. Applications. **Journal of Catalysis**, v. 10, p. 377-390, 1968.

BROWN, W. E.; CHOW, L. C. A new calcium phosphate setting cements. **Journal of Dental Research**, v. 62, p. 672, 1983.

BRUIJIN, J. D.; SEELEN, J. L.; FEENSTRA, R. M.; HANSEN, B. E.; BERNOSKI, F. P. Failure of the Mecring screw-ring acetabular component in total hip arthroplasty: a three to seven-year follow up study. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 77, n. 5, p. 760-766, 1995.

BURGUER, C. P.; MORAES, P. C.; MANISCALCO, C. L.; BORGES, P. A.; BATISTA, P. A. C. S.; CANOLA, J. C.; MEIRELLES, A. E. W. B.; SABINO, M. G.; ROSSETTO, H. Cimento de aluminato de cálcio: uso em defeitos ósseos induzidos em fêmur de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 757-762, 2013.

BURGUERA, E. F.; XU, H. H. K.; SUN, L. Injectable calcium phosphate cement: effects of power-to-liquid ratio and needle size. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B**, v. 84, n. 2, p. 493-502, 2008.

CAMILLERI, J.; MONTESIN, F. E.; CURTIS, R. V.; FORD, T. R. P. Characterization of Portland cement for use as a dental restorative material. **Dental Materials**, v. 22, n. 6, p. 569-575, 2006.

CAMPOS, L. S.; ROSA, F. P. Avaliação de hidroxiapatita bovina no reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de rato. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 11, n. 2, p. 177-183, 2012.

CANNON, C. Z.; KISSLING G. E.; HOENERHOFF, M. J.; KING-HERBERT, A. P.; BLANKENSHIP-PARIS, T. Evaluation of dosages and routes of administration of tramadol analgesia in rats using hot-plate and tail-flick tests. **Laboratory Animal**, v. 39, n. 11, p. 342-351, 2010.

CARRODEGUAS, R. G. **Cementos óseos de fosfatos de calcio**. 2000. 156 f. Tesis (Doctorado en Ciencias Químicas) - Centro de Biomateriales, Universidad de La Habana, La Habana, 2000.

CARRODEGUAS, R. G.; MONDÉJAR, S. P.; SANTOS, L. A.; RIGO, E. C. S.; BOSCHI, A. O. Cimentos de fosfatos de cálcio. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 10, p. 30-32, 1999.

CAVALCANTI, S. C.; PEREIRA, C. L.; MAZZONETTO, R.; MORAES, M. de; MOREIRA, R. W. Histological and histomorphometric analyses of calcium phosphate cement in rabbit calvaria. **Journal of Craniomaxillofacial Surgery**, v. 36, n. 6, p. 354-359, 2008.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 2000.

CHANRLEY, J. **Acrylic cement in orthopaedic surgery**. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1970. 131 p.

CHARRIERE, E.; TERRAZZONI, S.; PITTET, C.; MORDASINI, P.; DUTOIT, M.; LEMAITRE, J.; ZYSSET, P. H. Mechanical characterizations of brushite and hydroxyapatite cements. **Biomaterials**, v. 22, n. 21, p. 2937-2945, 2001.

CHAUVEL-LEBRET, D. J.; AUROY, P.; TRICOT-DOLEUX, S.; BONNAURE-MALLET, M. Evaluation of the capacity of the SCGE assay to assess the genotoxicity of biomaterials. **Biomaterials**, v. 22, n. 13, p. 1795-1801, 2001.

CHEN, C.; LI, H.; KONG, X. D.; ZHANG, S. M.; LEE, I. S. Immobilizing osteogenic growth peptide with and without fibronectin on a titanium surface: effects of loading methods on mesenchymal stem cell differentiation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 283-295, 2015.

CHEN, Z.; LIU, H.; LIU, X.; CUI, F.-Z. Injectable calcium sulfate/mineralized collagen-based bone repair materials with regulable self-setting properties. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 99A, p. 554-563, 2011.

CHEN, Z.; LIU, H.; LIU, X.; LIAN, X.; GUO, Z.; JIANG, H. J.; CUI, F. Z. Improved workability of injectable calcium sulfate bone cement by regulation of self-setting properties. **Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 33, n. 3, p. 1048-1053, 2013.

CHEN, Z. X.; CHANG, M.; PENG, Y. L.; ZHAO, L.; ZHAN, Y. R.; WANG, L. J.; WANG, R. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. **Regulatory Peptides**, v. 142, n. 1/2, p. 16-23, 2007.

CHENITE, A.; LE PAGE, Y.; SAYARI, A. Directing TEM imaging of tubules in calcined MSM-41 type mesoporous materials. **Chemistry of Materials**, v. 7, n. 5, p. 1015-1019, 1995.

CIESLA, U.; SCHÜTH, F. Ordered mesoporous materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 27, p. 131-149, 1999.

COHEN, Y.; SHOUSHAN, S. Y. Magnetic nanoparticles-based diagnostics and theranostics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 672-681, 2013.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.

CONSTANTZ, B. R.; ISON, I. C.; FULMER, M. T.; POSER, R. D.; SMITH, S. T.; VANWAGONER, M.; ROSS, J.; GOLDSTEIN, S. A.; JUPITER, J. B.; ROSENTHAL, D. I. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. **Science**, v. 267, n. 5205, p. 1796-1799, 1995.

CONSTANTZ, B. R.; BARR, B. M.; ISON, I. C.; FULMER, M. T.; BAKER, J.; McKINNEY, L.; GOODMAN, S. B.; GUNASEKAREN, S.; DELANEY, D. C.; ROSS, J.; POSER, R. D. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 43, n. 4, p. 451-461, 1998.

COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUZA, C. V.; LIRA, H. L. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4, n. 3, p. 29-38, 2009.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123-133, 2001.

DATT, A.; EL-MAAZAWI, I.; LARSEN, S. C. Aspirin loading and release from MCM-41 functionalized with amino propyl groups via co-condensation or post-synthesis

modification methods. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, p. 18358-18366, 2012.

DE AZA, P. N.; DE AZA, A. H.; DE AZA, S. Crystalline bioceramic materials. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, v. 44, p. 135-145, 2005.

DE LEONARDIS, D.; PECORA, G. E. Prospective study on the augmentation of the maxillary sinus with calcium sulfate: histological results. **Journal of Periodontology**, v. 71, p. 940-947, 2000.

DOADRIO, J. C.; ARCOS, D.; CABANAS, M. V.; VALLET-REGI, M. Calcium sulfate-based cements containing cephalixin. **Biomaterials**, v. 25, p. 2629-2635, 2004.

DOHMAE, Y.; BECHTOLD, J. E.; SHERMAN, R. E.; PUNO, R. M.; GUSTILO, R. B. Reduction in cement-bone interface shear strength between primary and revision arthroplasty. **Clinical Orthopaedics & Related Research**, v. 236, p. 214-220, 1988.

DOXA AKTIEBOLAG (United States). L. Kraft; L. Hermenasson. **Dimension stable binding agent system for dental application**. US 6620232B1, 8 out. 1999, 16 set. 2003.

DRIESSENS, F. C. M.; BOLTONG, M. G.; BERMUDEZ, O.; PLANELL, J. A. Formulation and setting time of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 4, p. 503-508, 1993.

DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A.; GIL, X. Calcium phosphates bone cements. In: WISE, D.; TRANTOLO, D.; ALTOBELLI, D.; YASZERNSKI, M.; GRESSER, J.; SCHWARTZ, E. (Ed.). **Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering**: part B: applications. New York: CRC Press, 1995. v. 2, chap. 31, p. 855-871.

DRIESSENS, F. C. M.; FERNANDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J. A. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. **Anales de Química**, v. 93, p. S38-S43, 1997.

DRIESSENS, F. C.; PLANELL, J. A.; BOLTONG, M. G.; KHAIROUN, I.; GINEBRA, M. P. Osteotransductive bone cements. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H**, v. 212, n. 6, p. 427-435, 1998.

DUAN, H.; LENG, S.; PAN, Z.; DAI, Y.; NIU, Y.; HUANG, C.; BIN, P.; WANG, Y.; LIU, Q.; CHEN, W.; ZHENG, Y. Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mutation Research**, v. 677, n. 1/2, p. 93-99, 2009.

EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.

EL-MAGHRABY, H. F.; GEDEON, O.; ROHANOVA, D.; GREISH, Y. E. Compressive strength and preliminary in vitro evaluation of gypsum and gypsum-polymer

composites in protein-free SBF at 37°C. **Ceramics International**, v. 36, p. 1561-1569, 2010.

ENGQVIST, H.; PERSSON, T.; LÖÖF, J.; FARIS, A.; HERMANSSON, L. Chemical stability of a novel injectable bioceramic for stabilization of vertebral compression fractures. **Trends Biomaterials and Artificial Organs**, v. 21, p. 98-106, 2008.

ENGSTRAND, J.; PERSSON, C.; ENGQVIST, H. The effect of composition on mechanical properties of brushite cements. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 29, p. 81-90, 2014.

EPPLEY, B. L.; PIETRZAK, W. S.; BLANTON, M. W. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 6, p. 981-989, 2005.

EPSTEIN, N. E. Pros, cons, and costs of INFUSE in spinal surgery. **Surgical Neurology International**, v. 2, p. 10, 2011. doi:10.4103/2152-7806.76147.

ETESHOLA, E.; BRILLSON, L. J.; LEE, S. C. Selection and characteristics of peptides that bind thermally grown silicon dioxide films. **Biomolecular Engineering**, v. 22, p. 201-204, 2005.

ETHELL, M. T.; BENNETT, R. A.; BROWN, M. P.; MERRITT, K.; DAVIDSON, J. S.; TRAN, T. In vitro elution of gentamicin, amikacin, and ceftiofur from polymethylmethacrylate and hydroxyapatite cement. **Veterinary Surgery**, v. 29, n. 5, p. 375-382, 2000.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FENECH M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERGUSON, J. Y.; DUDAREVA, M.; RILEY, N. D.; STUBBS, D.; ATKINS, B. L.; McNALLY, M. A. The use of a biodegradable antibiotic-loaded calcium sulphate carrier containing tobramycin for the treatment of chronic osteomyelitis: a series of 195 cases. **Bone and Joint Journal**, v. 96-B, n. 6, p. 829-836, 2014.

FERNANDEZ, E.; BOLTONG, M. G.; GINEBRA, M. P.; DRIESSENS, F. C. M.; BERMUDEZ, O.; PLANELL, J. A. Development of a method to measure the period of swelling of calcium phosphate cements. **Journal of Materials Science Letters**, v. 15, n. 11, p. 1004-1005, 1996.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxy-carbonyl amino acids. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 35, p. 161-214, 1999.

FOLDES, J.; STATTER, M.; MENCZEL, J.; NAPARSTEK, E.; BAB, I. Osteogenic response to marrow aspiration: increased serum osteocalcin and alkaline

phosphatase in human bone marrow donors. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 4, n. 4, p. 643-646, 1989.

FORNETTI, A. P. C.; LOURENÇO NETO, N.; MORETTI, A. B. S.; OLIVEIRA, T. M.; SAKAI, V. T.; SILVA, S. M. B.; MACHADO, M. A. A. M.; ABDO, R. C. C. Estudo clínico e radiográfico do formocresol de Buckley a 1/5 e do cimento Portland utilizados para pulpotomias em dentes decíduos humanos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 161-168, 2009.

FRAYSSINET, P.; GINESTE, L.; CONTE, P.; FAGES, J.; ROUQUET, N. Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. **Biomaterials**, v. 19, p. 971-977, 1998.

FRIEDMAN, C. D.; COSTANTINO, P. D.; TAKAGI, S.; CHOW, L. C. BoneSource hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 43, n. 4, p. 428-432, 1998.

GABARIN, N.; GAVISH, H.; MUHLRAD, A.; CHEN, Y.-C.; NAMDAR-ATTAR, M.; NISSENSON, R. A.; CHOREV, M.; BAB, I. Mitogenic Gi protein-MAP kinase signaling cascade in MC3T3-E1 osteogenic cells: activation by C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10-14)] and attenuation of activation by cAMP. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 81, p. 594-603, 2001.

GABET, Y.; MÜLLER, R.; REGEV, E.; SELA, J.; SHTEYER, A.; SALISBURY, K.; CHOREV, M.; BAB, I. Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 65-73, 2004.

GALLEGO-PEREZ, D.; HIGUITA-CASTRO, N.; QUIROZ, F. G.; POSADA, O. M.; LÓPEZ, L. E.; LITSKY, A. S.; HANSFORD, D. J. Portland cement for bone tissue engineering: effects of processing and metakaolin blends. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B**, v. 98, n. 2, p. 308-315, 2011.

GAVISH, H.; BAB, I.; TARTAKOYSKY, A.; CHOREV, M.; MANSUR, N.; GREENBERG, Z.; NAMDAR-ATTAR, M.; MUHLRAD, A. Human alpha(2)-macroglobulin is an osteogenic growth peptide binding protein. **Biochemistry**, v. 36, n. 48, p. 14883-14888, 1997.

GINEBRA, M. P.; TRAYKOVA, T.; PLANELL, J. A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 102-110, 2006a.

GINEBRA, M. P.; TRAYKOVA, T.; PLANELL, J. A. Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system? **Biomaterials**, v. 27, p. 2171-2177, 2006b.

GINEBRA, M. P.; FERNANDEZ, E.; MAEYER, E. A. P.; VERBEECK, R. M. H.; BOLTONG, M. G.; GINEBRA, J.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. **Journal of Dental Research**, v. 76, n. 4, p. 905-912, 1997.

GINEBRA, M. P.; FERNANDEZ, E.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A. Modeling of the hydrolysis of alpha-tricalcium phosphate. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 82, n. 10, p. 2808-2812, 1999.

GINEBRA, M. P.; RILLIARD, A.; FERNÁNDEZ, E.; ELVIRA, C.; SAN ROMÁN, J.; PLANELL, J. A. Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 57, n. 1, p. 113-118, 2001.

GINEBRA, M. P.; CANAL, C.; ESPANOL, M.; PASTORINO, D.; MONTUFAR, E. B. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 1090-1110, 2012.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 1, p. 14-24, 2011.

GREENBERG, Z.; CHOREV, M.; MUHLRAD, A.; SHTEYER, A.; NAMDAR, M.; MANSUR, N.; BAB, I. Mitogenic action of osteogenic growth peptide (OGP) - role of amino and carboxy-terminal regions and charge. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1178, n. 3, p. 273-280, 1993.

GREENBERG, Z.; CHOREV, M.; MUHLRAD, A.; SHTEYER, A.; NAMDAR-ATTAR, M.; CASAP, N.; TARTAKOVSKY, A.; VIDSON, M.; BAB, I. Structural and functional characterization of osteogenic growth peptide from human serum - identity with rat and mouse homologs. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, n. 8, p. 2330-2335, 1995.

GREENWALD, R. B. PEG drugs: an overview. **Journal of Controlled Release**, v. 74, p. 159-171, 2001.

GRONOWICZ, G.; RAISZ, L.G. Bone formation assays. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. (Ed.). **Principles of bone biology**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 1253-1265.

GROVER, L. M.; KNOWLES, J. C.; FLEMING, G. J.; BARRALET, J. E. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4233-4141, 2003.

GROVER, L. M.; WRIGHT, A. J.; GBURECK, U.; BOLARINWA, A.; SONG, J.; LIU, Y.; FARRAR, D. F.; HOWLING, G.; ROSE, J.; BARRALET, J. E. The effect of amorphous pyrophosphate on calcium phosphate cement resorption and bone generation. **Biomaterials**, v. 34, n. 28, p. 6631-6637, 2013.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; DUARTE, M. A. H.; GONÇALVES, M.; TANOMARU-FILHO, M. Radiopacity evaluation of root canal sealers containing calcium hydroxide and MTA. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 2, p. 119-123, 2009.

GUIMARÃES, K. B.; VASCONCELOS, B. C. E.; LIMEIRA JÚNIOR, F. A.; SOUSA, F. B.; ANDRADE, E. S. S.; VASCONCELLOS, R. J. H. Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 4, p. 447-454, 2011.

GUREVITCH, O.; SLAVIN, S.; MUHLRAD, A.; SHTEYER, A.; GAZIT, D.; CHOREV, M.; VIDSON, M.; NAMDAR-ATTAR, M.; BERGER, E.; BLEIBERG, I.; BAB, I. Osteogenic growth peptide increases blood and bone marrow cellularity and enhances engraftment of bone marrow transplants in mice. **Blood**, v. 88, p. 4719-4724, 1996.

HAN, B.; MA, P.-W.; ZHANG, L.-L.; YIN, Y.-J.; YAO, K.-D.; ZHANG, F.-J.; ZHANG, Y.-D.; LI, X.-L.; NIE, W. β -TCP/MCPM-based premixed calcium phosphate cements. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 3165-3177, 2009.

HE, Q.; CHEN, H.; HUANG, L.; DONG, J. GUO, D.; MAO, M.; LIANG, K.; LI, Y.; WU, Z.; LEI, W. Porous surface modified bioactive bone cement for enhanced bone bonding. **PLoS One**, v. 7, n. 8, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0042525.

HENCH, L. L. The story of Bioglass®. **Journal of Materials Science: Material in Medicine**, v. 19, p. 967-978, 2006.

HENCH, L. L.; PASCHALL, H. A. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 7, n. 3, p. 25-42, 1973.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to bioceramics**. Singapore: Word Scientific; 1993.

HENCH, L. L.; SPLINTER, R. J.; ALLEN, W. C.; GREENLEE, T. K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **Journal of Biomedical Materials Research Symposium**, v. 2, p. 117-141, 1971.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained action medication theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 52, p. 1145-1149, 1963.

HING, K. A.; WILSON, L. F.; BUCKLAND, T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. **Spine Journal**, v. 7, p. 475-490, 2007.

HOFFMANN, F.; CORNELIUS, M.; MORELL, J.; FRÖBA, M. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 3216-3251, 2006.

HOFMANN, G. O. Biodegradable implants in orthopaedic surgery – a review on the state-of-the-art. **Clinical Materials**, v. 10, p. 75-80, 1992.

HOFMANN, M. P.; MOHAMMED, A. R.; PERRIE, Y.; GBURECK, U.; BARRALET, J. E. High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities. **Acta Biomaterialia**, v. 3, p. 43-49, 2009.

HOLLAND, R.; SOUZA, V. de; NERY, M. J.; FARACO JÚNIOR, I. M.; BERNABÉ, P. F.; OTOBONI FILHO, J. A.; DEZAN JÚNIOR, E. Reaction of rat tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. **Brazilian Dental Journal**, v. 12, n. 1, p. 3-8, 2001.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HUAN, Z.; CHANG, J. Calcium-phosphate-silicate composite bone cement: self-setting properties and in vitro bioactivity. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. 833-841, 2009.

HUGHES, E.; YANNI, T.; JAMSHIDI, P.; GROVER, L. M. Inorganic cements for biomedical application: calcium phosphate, calcium sulphate and calcium silicate. **Advances in Applied Ceramics**, v. 114, n. 2, p. 65-76, 2015.

IEZZI, G.; FIERA, E.; SCARANO, A.; PECORA, G.; PIATTELLI, A. Histologic evaluation of a provisional implant retrieved from man 7 months after placement in a sinus augmented with calcium sulphate: a case report. **Journal of Oral Implantology**, v. 33, p. 89-95, 2007.

IMPEROR-CLERC, M.; DAVIDSON, P.; DAVIDSON, A. Existence of a microporous corona around the mesopores of silica-based SBA-15 material template by triblock copolymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, p. 11925-11933, 2000.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5**. Biological evaluation of medical devices - part 5: tests for in vitro cytotoxicity. 3rd ed. Geneva, 2009. 42 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 23317**. Implants for surgery: in vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials. Geneva, 2007. 13 p.

ISHIKAWA, K.; TAKAGI, S.; CHOW, L. C.; SUZUKI, K. Reaction of calcium phosphate cements with different amounts of tetracalcium phosphate and dicalcium phosphate anhydrous. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 46, n. 4, p. 504-510, 1999.

IZQUIERDO-BARBA, I.; SOUSA, E.; DOADRIO, J. C.; DOADRIO, A. L.; PARIENTE, J. P.; MARTÍNEZ, A.; BABONNEAU, F.; VALLET-REGÍ, M. Influence of mesoporous structure type on the controlled delivery of drugs: release of iuprofen from MCM-48, SBA-15 and functionalized SBA-15. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 50, p. 421-429, 2009.

JACOBOVITZ, M.; LIMA, R. K. P. de. Treatment of inflammatory internal root resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. **International Endodontic Journal**, v. 41, p. 905-912, 2008.

KAISER, E.; COLLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phases synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KANELLAKOPOULOU, K.; GALANOPOULOS, I.; SORANOGLU, V.; TSAGANOS, T.; TZIORTZIOTI, V.; MARIS, I.; PAPALOIS, A.; GIAMARELLOU, H.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a synthetic carrier of calcium sulphate (Stimulan) releasing moxifloxacin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 4, p. 354-359, 2009.

KANG, K.; CHOI, J.; NAM, J. H.; LEE, S. C.; KIM, K. J.; LEE, S. W.; CHANG, J. H. Preparations and characterization of chemically functionalized silica-coated magnetic nanoparticles as a DNA separator. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 536-543, 2009.

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

KELLY, C. M.; WILKINS, R. M.; GITELIS, S.; HARTJEN, C.; WATSON, J. T.; KIM, P. T. The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 382, p. 42-50, 2001.

KEMPEN, D. H.; CREEMERS, L. B.; ALBLAS, J.; LU, L.; VERBOUT, A. J.; YASZEMSKI, M. J.; DHERT, W. J. Growth factor interactions in bone regeneration. **Tissue Engineering Part B**, v. 16, n. 6, p. 551-566, 2010.

KERNEOS ALUMINATES TECHNOLOGIES. **Secar® 71**. Paris, 2006. 2 p. Reference PDS-US-S71-8/06.

KHAIROUN, I.; BOLTONG, M. G.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A. Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 9, p. 425-428, 1998.

KLAMMERT, C.; REUTHER, T.; JAHN, C.; KRASKI, B.; KÜBLER, A. C.; GBURECK, U. Cytocompatibility of brushite and monite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 727-734, 2009.

KNABE, C.; BERGER, G.; GILDENHAAR, R.; KLAR, F.; ZREIQAT, H. The modulation of osteogenesis in vitro by calcium titanium phosphate coatings. **Biomaterials**, v. 25, p. 4911-4919, 2004.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communications**, v. 3, p. 103-115, 1995.

- KOBAYASHI, N.; ONG, K.; VILLARRAGA, M.; SCHWARDT, J.; WENZ, R.; TOGAWA, D.; FUJISHIRO, T.; TURNER, A. S.; SEIM, H. B. III; BAUER, T. W. Histological and mechanical evaluation of self-setting calcium phosphate cements in a sheep vertebral bone void model. **Journal of Biomedical Material Research, Part A**, v. 81, n. 4, p. 838-846, 2007.
- KOH, E. T.; TORABINEJAD, M.; PITT, T. R. F.; BRADY, K.; McDONALD, F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 37, p. 432-439, 1997.
- KOH, E. T.; McDONALD, F.; PITT, T. R. F.; TORABINEJAD, M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 24, p. 543-547, 1998.
- KOKUBO, T. **Bioceramics and their clinical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2008.
- KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907-2915, 2006.
- KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, p. 2161-2175, 2003.
- KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 24, p. 721-734, 1990.
- KOOLE, R.; VAN SCHOONEVELD, M. M.; HILHORST, J.; CASTERMANS, K.; CORMODE, D. P.; STRIJKERS, G. J.; DONEGA, C. M.; VANMAEKELBERGH, D.; GRIFFIOEN, A. W.; NICOLAY, K.; FAYAD, Z. A.; MEIJERINK, A.; MULDER, W. J. Paramagnetic lipid-coated silica nanoparticles with a fluorescent quantum dot core: a new contrast agent platform for multimodality imaging. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, p. 2471-2479, 2008.
- KUEHN, K.; EGE, W.; GOPP, U. Acrylic bone cements: composition and properties. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 17-28, 2005.
- KUEMMERLE, J. M.; ABERLE, A.; OECHSLIM, C.; BOHNER, M.; FREI, C.; BOECKEN, I.; VON RECHENBERG, B. Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep. **Journal of Craniomaxillofacial Surgery**, v. 33, p. 37-44, 2005.
- KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Analytical Biochemistry**, v. 182, n. 1, p. 16-19, 1989.
- KUMAR, C. Y.; NALINI, K. B.; MENON, J.; PATRO, D. K.; BANERJI, H. B. Calcium sulfate as bone graft substitute in the treatment of osseous bone defects, a prospective study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 12, p. 2926-2928, 2013.

- KURASHINA, K.; KURITA, H.; HIRANO, M.; KOTANI, A.; KLEIN, C. P.; GROOT, K. Calcium phosphate cement: in vitro and in vivo studies of the α -tricalcium phosphate-dicalcium phosphate dibasic-tetracalcium phosphate monoxide system. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 6, n. 6, p. 340-347, 1995.
- KVETON, J. F.; COELHO, D. H. Hydroxyapatite cement in temporal bone surgery: a 10 year experience. **Laryngoscope**, v. 114, p. 33-37, 2004.
- LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.
- LAZÁRY, A.; BALLA, B.; KÓSA, J. P.; BÁCSI, K.; NAGY, Z.; TAKÁCS, I.; VARGA, P. P.; SPEER, G.; LAKATOS, P. Effect of gypsum on proliferation and differentiations of MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells. **Biomaterials**, v. 28, p. 393-399, 2007.
- LE GUEHENNEC, L.; GOYENVALLE, E.; AGUADO, E.; HOUCHMAND-CUNY, M.; ENKEL, B.; PILET, P.; DACULSI, G.; LAYROLLE, P. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B**, v. 72, n. 1, p. 69-78, 2005.
- LEA, F. M. **The chemistry of cement and concrete**. 3rd ed. Glasgow: Edward Arnold, 1970.
- LEBOURG, L.; BIOU, C. The imbedding of plaster of Paris in surgical cavities of the jaws. **Semaine des Hopitaux**, v. 37, 1195-1197, 1961.
- LEE, J. E.; LEE, N.; KIM, T.; KIM, J.; HYEON, T. Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for theranostic applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 893-902, 2011.
- LEE, W. E.; VIEIRA, W.; ZHANG, S.; AHARI, K. G.; SARPOOLAKY, H.; PARR, C. Castable refractory concretes. **International Materials Reviews**, v. 46, n. 3, p. 145-168, 2001.
- LEGEROS, R. Z. Apatites in biological systems. **Progress in Crystal Growth and Characterization Materials**, v. 4, n. 1/2, p. 1-45, 1981.
- LEGEROS, R. Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine**. New York: Karger, 1991.
- LEGEROS, R. Z.; CHOAYEB, A.; SHULMAN, A. Apatitic calcium phosphates: possible dental restorative materials. **Journal of Dental Research**, v. 61, p. 343, 1982.
- LEMAITRE, J.; MIRTCHI, A.; MORTIER, A. Calcium phosphate cement for medical use: state of the art and perspectives of development. **Indian Ceramic Science and Technology**, v. 52, p. 141-146, 1987.

LI, H.; GU, J.; ALI SHAH, L.; SIDDIQ, M.; HU, J.; CAI, X.; YANG, D. Bone cement based on vancomycin loaded mesoporous silica nanoparticle and calcium sulfate composites. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 210-216, 2015.

LI, P.; OHTSUKI, C.; KOKUBO, T.; NAKANISHI, K.; SOGA, N.; NAKAMURA, T.; YAMAMURO, T. Apatite formation induced on sílica gel in a simulated body fluid. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 75, p. 2094-2097, 1992.

LIAO, J. C.; FAN, K. F.; KEOROCHANA, G.; CHEN, W. J.; CHEN, L. H. Transpedicular grafting after short-segment pedicle instrumentation for thoracolumbar burst fracture: calcium sulfate cement versus autogenous iliac bone graft. **Spine**, v. 35, n. 15, p. 1482-1488, 2010.

LIBICHER, M.; HILLMEIER, J.; LIEGIBEL, U.; SOMMER, U.; PYERIN, W.; VETTER, M.; MEINZER, H. P.; GRAFE, I.; MEEDER, P.; NÖLDGE, G.; NAWROTH, P.; KASPERK, C. Osseous integration of calcium phosphate in osteoporotic vertebral fractures after kyphoplasty: initial results from a clinical and experimental pilot study. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 8, p. 1208-1215, 2006.

LIU, F.; WANG, J.; HUANG, P.; ZHANG, Q.; DENG, J.; CAO, Q.; JIA, J.; CHENG, J.; FANG, Y.; DENG, D. Y. B.; ZHOU, W. Outside-in stepwise functionalization of mesoporous silica nanocarriers for matrix type sustained release of fluoroquinolone drugs. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, p. 2206-2214, 2015.

LOSSDORFER, S.; SCHWARTZ, Z.; LOHMANN, C. H.; GREENSPAN, D. C.; RANLY, D. M.; BOYAN, B. D. Osteoblast response to bioactive glasses in vitro correlates with inorganic phosphate content. **Biomaterials**, v. 25, n. 13, p. 2547-2555, 2004.

LOZANO, D.; MANZANO, M.; DOADRIO, J. C.; SALINAS, A. J.; VALLET-REGÍ, M.; GÓMEZ-BARRENA, E.; ESBRIT, P. Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 797-803, 2010.

LUO, Z.; DENG, Y.; ZHANG, R.; WANG, M.; BAI, Y.; ZHAO, Q.; LYU, Y.; WEI, J.; WEI, S. Peptide-laden mesoporous silica nanoparticles with promoted bioactivity and osteo-differentiation ability for bone tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 131, p. 73-82, 2015.

LUZ, A. P.; BORBA, N. Z.; PANDOLFELLI, V. C. Evolução da resistência mecânica e dos produtos de hidratação de um cimento de aluminato de cálcio, visando sua aplicação na endodontia. **Cerâmica**, v. 60, p. 192-198, 2014.

MACHADO, A. Meninges - Liquor. In: _____. **Neuroanatomia funtional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1993. Cap. 9, p. 75-86.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, T. M. Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

- MACHADO, J. L. M.; SANTOS, L. A. Production and use of paraffin microspheres for tissue scaffolds based on α -tricalcium phosphate cement. **Cerâmica**, v. 55, p. 216-222, 2009.
- MAIA, F. R.; BARBOSA, M.; GOMES, D. B.; VALE, N.; GOMES, P.; GRANJA, P. L.; BARRIAS, C. C. Hydrogel depots for local co-delivery of osteoinductive peptides and mesenchymal stem cells. **Journal of Controlled Release**, v. 189, p. 158-168, 2014.
- MAIER, A.-K.; DEZMIREAN, L.; WILL, J.; GREIL, P. Three-dimensional printing of flash-setting calcium aluminate cement. **Journal of Materials Science**, v. 26, n. 9, p. 2947-2954, 2010.
- MAIN, C.; MIRZAYAN, N.; SHABAHANG, S.; TORABINEJAD, M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. **Journal of Endodontics**, v. 30, p. 80-83, 2004.
- MAJER, B. J.; TSCHERKO, D.; PASCHKE, A.; WENNRICH, R.; KUNDI, M.; KANDELER, E.; KNASMULLER, S. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. **Mutation Research**, v. 515, p. 111-124, 2002.
- MANSOS, P. A. O. **Produção de cimentos ósseos à base de fosfato de cálcio**. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.
- MANZANO, M.; AINA, V.; AREÁM, C. O.; BALAS, F.; CAUDA, V.; COLILLA, M.; DELGADO, M. R.; VALLET-REGÍ, M. Studies on MSM-41 mesoporous sílica for drug delivery: effect of particle morphology and amine functionalization. **Chemical Engineering Journal**, v. 137, p. 30-37, 2008.
- MANZANO, M.; LOZANO, D.; ARCOS, D.; PORTAL-NUÑEZ, S.; ORDEN, C. L.; ESBRI, P.; VALLET-REGÍ, M. Comparison of the osteoblastic activity conferred on Si-doped hydroxyapatite scaffolds by different osteostatin coatings. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 3555-3562, 2011.
- MARIE, P.J. The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. **Bone**, v. 46, p. 571-576, 2010.
- MARIÑO, F. T.; TORRES, J.; TRESGUERRES, I.; JEREZ, L. B.; CABARCOS, E. L. Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 81, n. 1, p. 93-102, 2007.
- MARKER, B.; OBERHAGEMANN, U.; VORTMANN, S.; GIES, H. Influence of the sorbate type on the XRD peak intensities of loaded MCM-41. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 6, p. 375-383, 1996.
- MARTINEZ-VAZQUEZ, F. J.; PERERA, F. H.; MIRANDA, P.; PAJARES, A.; GUIBERTEAU, F. Improving the compressive strength of bioceramic robocast scaffolds by polymer infiltration. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 11, p. 4361-4368, 2011.

MATTII, L.; BATTOLLA, B.; MOSCATO, S.; FAZZI, R.; GALIMBERTI, S.; BERNARDINI, N.; DOLFI, A.; PETRINI, M. The small peptide OGP(10-14) acts through Src kinases and RhoA pathways in Mo-7e cells: morphologic and immunologic evaluation. **Medical Science Monitor**, v. 14, n. 6, p. BR103-BR108, 2008.

McKEE, M. D.; LI-BLAND, E. A.; WILD, L. M.; SCHEMITSCH, E. H. A prospective, randomized clinical trial comparing an antibiotic-impregnated bioabsorbable bone substitute with standard antibiotic-impregnated cement beads in the treatment of chronic osteomyelitis and infected nonunion. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 24, n. 8, p. 483-490, 2010.

MENDES, L. S.; SASKA, S.; MARTINES, M. A. U.; MARCHETTO, R. Nanostructured materials based on mesoporous sílica and mesoporous sílica/apatite as osteogenic growth peptide carriers. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 4427-4434, 2013.

MERRIFIELD, R. B. **Solid phase peptide synthesis**. 2nd ed. New York: Pierce Chemical, 1984.

MIGUEL, S. M. S.; NAMDAR-ATTAR, M.; NOH, T.; FRENKEL, B.; BAB, I. ERK1/2-activated de novo Mapkapk2 synthesis is essential for osteogenic growth peptide mitogenic signaling in osteoblastic cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 37495-37502, 2005.

MIRTCHI, A. A.; LEMAITRE, J.; TERAOKA, N. Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate system. **Biomaterials**, v. 10, p. 634-638, 1989.

MISCH, C. E. **Implantes dentários contemporâneos**. São Paulo: Livraria Santos, 2006.

MITCHELL, P. J.; PITT, T. R. F.; TORABINEJAD, M.; McDONALD, F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. **Biomaterials**, v. 20, p. 167-173, 1999.

MONTALDI, A. P. L. **Avaliação da resposta celular mediada pelo quimioterápico temozolomida associada ao inibidor do reparo do DNA metoxiamina em linhagens de glioblastoma**. 2009. 62 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MOORE, N. M.; LIN, N. J.; GALLANT, N. D.; BECKER, M. L. The use of immobilized osteogenic growth peptide on gradient substrates synthesized via click chemistry to enhance MC3T3-E1 osteoblast proliferation. **Biomaterials**, v. 31, p. 1604-1611, 2010.

MOREJÓN, L.; MENDIZÁBAL, A. E.; GARCÍA-MENOCAL, J. A.; GINEBRA, M. P.; APARICIO, C.; MUR, F. J.; MARSAL, M.; DAVIDENKO, N.; BALLESTEROS, M. E.; PLANELL, J. A. Static mechanical properties of hydroxyapatite (HA) powder-filled

acrylic bone cements: effect of type of HA powder. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B**, v. 72, n. 2, p. 345-352, 2005.

MOREJÓN-ALONSO, L.; CARRODEGUAS, R. G.; SANTOS, L. A. dos. Development and characterization of a-tricalcium phosphate/monocalcium aluminate composite bone cement. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 5, p. 448-456, 2012.

MOREJÓN-ALONSO, L.; SANTOS, L. A. dos; CARRODEGUAS, R. G. Influence of mixing liquido on the properties of calcium aluminate cement. **Key Engineering Materials**, v. 396-398, p. 241-244, 2009.

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

NAITO, Y.; TERUKINA, T.; GALLI, S.; KOZAI, Y.; VANDEWEGHE, S.; TAGAMI, T.; OZEKI, T.; ICHIKAWA, T.; COELHO, P. G.; JIMBO, R. The effect of simvastatin-loaded polymeric microsphere in a critical size bone defect in the rabbit calvaria. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, p. 157-162, 2014.

NAKADE, O.; TAKAHASHI, K.; TAKUMA, T.; AOKI, T.; KAKU, T. Effect of extracellular calcium on the gene expression of bone morphogenetic protein-2 and -4 of normal human bone cells. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 13-19, 2001.

NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; KLOKKEVOLD, P. R.; CARRANZA, F. A. **Periodontia clínica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

OBRANT, K. J.; IVASKA, K. K.; GERDHEM, P.; ALATALO, S. L.; PETTERSSON, K.; VÄÄNÄNEN, H. K. Biochemical markers of bone turnover are influenced by recently sustained fracture. **Bone**, v. 36, n. 5, p. 786-792, 2005.

OLIVEIRA, I. R.; PANDOLFELLI, V. C.; JACOBOVITZ, M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. **International Endodontic Journal**, v. 43, p. 1069-1076, 2010.

OOMS, E. M.; WOLKE, J. G.; VAN DER WAERDEN, J. P.; JANSEN, J. A. Use of injectable calcium-phosphate cement for the fixation of titanium implants: an experimental study in goats. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B**, v. 66, n. 1, p. 447-456, 2003.

OTSUKA, M.; MATSUKA, Y.; WANG, Z.; FOX, J. L.; HIGUCHI, W. I. Effect of sodium bicarbonate amount on in vitro indomethacin release from self-setting carbonated-apatite cement. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 444-449, 1997.

PADILLA, S.; ROMÁN, J.; SÁNCHEZ-SALCEDO, S.; VALLET-REGÍ, M. Hydroxyapatite/SiO₂-CaO-P₂O₅ glass materials: in vitro bioactivity and biocompatibility. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 331-342, 2006.

PANSERI S.; RUSSO, L.; MONTESI, M.; TARABALLI, F.; CUNHA, C.; MARCACCI, M.; CIPOLLA, L. Bioactivity of surface tethered osteogenic growth peptides motifs. **Medicinal Chemical Communications**, v. 5, p. 899-903, 2014.

PARK, Y. I.; KIM, H. M.; KIM, J. H.; MOON, K. C.; YOO, B.; LEE, K. T.; LEE, N.; CHOI, Y.; PARK, W.; LING, D.; NA, K.; MOON, W. K.; CHOI, S. H.; PARK, H. S.; YOON, S. Y.; SUH, Y. D.; LEE, S. H.; HYEON, T. Theranostic probe based on lanthanide-doped nanoparticles for simultaneous in vivo dual-modal imaging and photodynamic therapy. **Advanced Materials**, v. 24, n. 42, p. 5755-5761, 2012.

PARKER, K. M.; SHARP, J. H. Refractory calcium aluminate cements. **Journal of the British Ceramic Society**, v. 81, p. 35-42, 1982.

PARR, C.; WOHRMEYER, C. **The advantages of calcium aluminate cement as a castable bonding system**. Paris: Lafarge Aluminates, 2006. 20 p. (Technical paper, TP-GB-RE-LAF-052).

PASCUAL, B.; VAZQUEZ, B.; GURRUCHAGA, M.; GONI, I.; GINEBRA, M. P.; GIL, F. J.; PLANELL, J. A.; LEVENFELD, B.; SAN ROMAN, J. New aspects of the effect of size distribution on the setting parameters and mechanical properties of acrylic bone cements. **Biomaterials**, v. 17, n. 5, p. 509-516, 1996.

PELTIER, L. F. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. **Clinical Orthopaedics**, v. 21, p. 1-29, 1961.

PELTIER, L. F.; JONES, R. F. Treatment of unicameral bone cysts by curettage and packing with plaster-of-Paris pellets. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 60, n. 6, p. 820-822, 1978.

PELTIER, L. F.; BICKEL, E. Y.; LILLO, R.; THEIN, M. S. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. **Annals of Surgery**, v. 146, n. 1, p. 61-69, 1957.

PEREIRA, M. M.; CLARK, A. E.; HENCH, L. L. Effect of texture on the rate of hydroxyapatite formation on silica gel surface. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 78, n. 9, p. 2463-2468, 1995.

PEREIRA, M. de M.; VASCONCELOS, W. L.; ZAVAGLIA, C. A. C. Materiais cerâmicos - ciência e aplicação como biomateriais. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. de M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. p. 61-81.

PERELMAN-KARMON, M.; KOZLOVSKY, A.; LILOY, R.; ARTZI, Z. Socket site preservation using bovine bone mineral with and without a bioresorbable collagen membrane. **Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 32, n. 4, p. 459-465, 2012.

PEREZ, R. A.; KIM, T.-H.; KIM, M.; JANG, J.-H.; GINEBRA, M. P.; KIM, H.-W. Calcium phosphate cements loaded with basic fibroblast growth factor: delivery and

in vitro cell response. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 101A, n. 4, p. 923-931, 2013.

PIGOSSI, S. C.; OLIVEIRA, G. J. P. L.; FINOTI, L. S.; NEPOMUCENO, R.; SPOLIDORIO, L. C.; ROSSA, C.; RIBEIRO, S. J. L.; SASKA, S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. **Journal of Biomedical Material Research, Part A**, v. 103, p. 3397-3406, 2015.

PINTO, J. G. S.; CIPRANDI, M. T. O.; AGUIAR, R. C.; LIMA, P. V. P.; HERNANDEZ, P. A. G.; SILVA JÚNIOR, A. N. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais: uma revisão de conceitos atuais. **RFO UPF**, v. 12, n. 3, p. 79-84, 2007.

POLICASTRO, G. M.; BECKER, M. L. Osteogenic growth peptide and its use as a bio-conjugate in regenerative medicine applications. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, 2015. doi:10.1002/wnan.1376.

POLICASTRO, G. M.; LIN, F.; SMITH-CALLAHAN, L. A.; ESTERLE, A.; GRAHAM, M.; STAKLEFF, K. S.; BECKER, M. L. OGP-functionalized phenylalanine based poly(ester urea) for enhancing osteoinductive potential of human mesenchymal stem cells. **Biomacromolecules**, v. 16, p. 1358-1371, 2015.

POLINI, A.; WANG, J.; BAI, H.; ZHU, Y.; TOMSIA, A. P.; MAO, C. Stable biofunctionalization of hydroxyapatite (HA) surfaces by HA-binding/osteogenic modular peptides for inducing osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Biomaterials Science**, v. 2, p. 1779-1786, 2014.

PRYOR, L. S.; GAGE, E.; LANGEVIN, C. J.; HERRERA, F.; BREITHAUPT, A. D.; GORDON, C. R.; AFIFI, A. M.; ZINS, J. E.; MELTZER, H.; GOSMAN, A.; COHEN, S. R.; HOLMES, R. Review of Bone Substitutes. **Craniofacial, Trauma and Reconstruction**, v. 2, n. 3, p. 151-160, 2009.

PROUZET, E.; COT, F.; NABIAS, G.; LARBOT, A.; KOOYMAN, P.; PINNAVAIA, J. Assembly of mesoporous silica molecular sieves based on nonionic ethoxylated sorbitan esters as structure directors. **Chemistry of Materials**, v. 11, p. 1498-1503, 1999.

PUCK, T. T.; MARCUS, P. I. Action of x-rays on mammalian cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 103, n. 5, p. 653-666, 1956.

PUDDU, V.; PERRY, C. C. Peptide adsorption on silica nanoparticles: evidence of hydrophobic interactions. **ACS Nano**, v. 6, n. 7, p. 6356-6363, 2012.

QI, Y. Y.; WANG, Y. L.; YAN, W. Q.; LI, H.; SHI, Z. L.; PAN, Z. J. Combined mesenchymal stem cell sheets and rhBMP-2-releasing calcium sulfate-rhBMP-2 scaffolds for segmental bone tissue engineering. **Cell Transplantation**, v. 21, n. 4, p. 693-705, 2012.

QUARLES, L. D.; YOHAY, D. A.; LEVER, L. W.; CATON, R.; WENSTRUP, R. J. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 6, p. 683-692, 1992.

RAHMAN, Q.; LOHANI, M.; DOPP, E.; PEMSEL, H.; JONAS, L.; WEISS, D. G.; SCHIFFMANN, D. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in syrian hamster embryo fibroblasts. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 8, p. 797-800, 2002.

RAUCCI, L. M. S. de C. **Efeitos de diferentes preparações de cimento de aluminato de cálcio sobre culturas**. 2013. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

RAUCCI, L. M. S. de C.; OLIVEIRA, I. R.; TEIXEIRA, L. N.; ROSA, A. L.; OLIVEIRA, P. T.; JACOBOWITZ, M. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, p. 99-104, 2011.

RAUSCHMANN, M. A.; WICHELHAUS, T. A.; STIRNAL, V.; DINGELDEIN, E.; ZICHNER, L.; SCHNETTLER, R.; ALT, V. Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2677-2684, 2005.

REED, J. S. **Principles of ceramics processing**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1995.

RING, M. E. A thousand years of dental implants: a definitive history - part 1. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 16, n. 10, p. 1060-1064, 1995.

ROBINSON, D.; BAB, I.; NEVO, Z. Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 5, p. 690-696, 1995.

ROCHA, C. A. **Peptídeos derivados da toxina ParE: síntese, estrutura e estudos de inibição de DNA topoisomerasas**. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

ROCHA, L. A. **Materiais meso-estruturados luminescentes**. 2010. 172 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

ROEMHILDT, M. L.; WAGNER, S. D.; MCGEE, T. D. Characterization of novel calcium phosphate composite bone cement: flow, setting and aging properties. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 17, p. 1127-1132, 2006.

ROJBANI, H.; NYAN, M.; OHYA, K.; KASUGAI, S. Evaluation of the osteoconductivity of alpha-tricalcium phosphate, beta-tricalcium phosphate and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 98, p. 488-498, 2011.

ROSA, A. L.; BRENTAGANI, L. G.; GRANDINI, S. A. Hydroxylapatite and tricalcium phosphate implants in the dental alveolus of rats: a histometric study. **Brazilian Dental Journal**, v. 6, p. 103-109, 1995.

ROSENBLUM S. F.; FRENKEL, S.; RICCI, J. R.; ALEXANDER, H. Diffusion of fibroblast growth factor from a plaster of Paris carrier. **Journal of Applied Biomaterials**, v. 4, p. 67-72, 1993.

ROY, D. M. New strong cement materials: chemically bonded ceramics. **Science**, v. 235, p. 651-657, 1987.

SAIDON, J.; HE, J.; ZHU, Q.; SAFAVI, K.; SPÅNGBERG, L. S. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 95, p. 483-489, 2003.

SAN MIGUEL, B.; KRIAUCIUNAS, R.; TOSATTI, S.; EHRBAR, M.; GHAYOR, C.; TEXTOR, M.; WEBER, F. E. Enhanced osteoblastic activity and bone regeneration using surface-modified porous bioactive glass scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 94A, n. 4, p. 1023-1033, 2010.

SANICOLA, S. M.; ALBERT, S. F. The in vitro elution characteristics of vancomycin and tobramycin from calcium sulfate beads. **Journal of Foot and Ankle Surgery**, v. 44, n. 2, p. 121-124, 2005.

SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico odontológica**. 2002. 274 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

SANTOS, L. A.; CARRODEGUAS, R. G.; ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; BOSCHI, A. O.; ARRUDA, A. C. F. Alfa-tricalcium phosphate cement: in vitro cytotoxicity. **Biomaterials**, v. 23, n. 9, p. 2035-2042, 2002.

SANTOS, A. D.; MORAES, J. C. S.; ARAUJO, E. B.; YUKIMITU, K.; VALERIO FILHO, W. V. Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. **International Endodontic Journal**, v. 38, p. 443-447, 2005.

SASKA, S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; TEIXEIRA, L. N.; FRANCHI, L. P.; SANTOS, R. A.; GASPAR, A. M. M.; OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L.; TAKAHASHI, C. S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; MARCHETTO, R. Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 9, p. 2253-2266, 2012.

SASKA, S.; MENDES, L. S.; MINARELLI, A. M. M.; CAPOTE, T. S. O. Bone substitute materials in implant dentistry. In: TURKYILMAZ, I. (Ed.). **Current concepts in dental implantology**. Rijeka: Intech, 2015. Chap. 2. doi:10.5772/54487.

SCARANO, A.; ORSINI, G.; PECORA, G.; IEZZI, G.; PERROTTI, V.; PIATTELLI, A. Peri-implant bone regeneration with calcium sulfate: a light and transmission electron microscopy case report. **Implant Dentistry**, v. 16, p. 195-203, 2007.

SEEHERMAN, H. J.; AZARI, K.; BIDIC, S.; ROGERS, L.; LI, X. J.; HOLLINGER, J. O.; WOZNEY, J. M. rhBMP-2 delivered in a calcium phosphate cement accelerates bridging of critical-sized defects in rabbit radii. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 88, n. 7, p. 1553-1565, 2006.

SEPULVEDA, P.; BRESSIANI, A. H.; BRESSIANI, J. C.; MESEGUER, L.; KONIG, B. Jr. In vivo evaluation of hydroxyapatite foams. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, p. 587-92, 2002.

SHEN, S.-C.; NG, W. K.; SHI, Z.; CHIA, L.; NEOH, K. G.; TAN, R. B. H. Mesoporous silica nanoparticle-functionalized poly(methyl methacrylate)-based bone cement for effective antibiotics delivery. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, p. 2283-2292, 2011.

SHUQIANG, M.; KUNZHENG, W.; XIAOQIANG, D.; WEI, W.; MINGYU, Z.; DAOCHENG, W. Osteogenic growth peptide incorporated into PLGA scaffolds accelerates healing of segmental long bone defects in rabbits. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 61, n. 12, p. 1558-1560, 2008.

SIDQUI, M.; COLLIN, P.; VITTE, C.; FOREST, N. Osteoblast adherence and resorption activity of isolated osteoclasts on calcium sulphate hemihydrate. **Biomaterials**, v. 16, p. 1327-1332, 1995.

SILVA, E. J.; HERRERA, D. R.; ALMEIDA, J. F.; FERRAZ, C. C.; GOMES, B. P.; ZAIA, A. A. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 9, p. 815-820, 2012.

SILVA, E. J.; HERRERA, D. R.; ROSA, T. P.; DUQUE, T. M.; JACINTO, R. C.; GOMES, B. P.; ZAIA, A. A. Evaluation of cytotoxicity, antimicrobial activity and physicochemical properties of a calcium aluminate-based endodontic material. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 1, p. 61-67, 2014.

SILVA, S. N.; PEREIRA, M. M.; GOES, A. M.; LEITE, M. F. Effect of biphasic calcium phosphate on human macrophage functions in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 65, n. 4, p. 475-481, 2003.

SIMÕES, F. G.; BRITO e DIAS, R.; BARATTO FILHO, R.; CARVALHO, J. C. M. Avaliação microscópica do cimento portland comum e do cimento portland branco não estrutural incluídos na calvária de ratos. **Revista do Médico Residente**, v. 12, n. 1, p. 10-21, 2010.

SING, K. S. W.; EVERETT, D. H.; HAUL, R. A. W.; MOSCOU, L.; PIEROTTI, R. A.; ROUQUEROL, J.; SIEMIENIEWSKA, T. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). **Pure and Applied Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-91, 1988.

SLOWING, I. I.; TREWYN, B. G.; GIRI, S.; LIN, V. S. Y. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. **Advanced Functional Materials**, v. 17, p. 1225-1236, 2007.

SOCIÉTÉ J&A. PAVIN DE LAFARGE (França). **Method of production of cement**. FR 391454, 13 jun. 1908, 02 nov. 1908.

SONG, S. W.; HIDAJAT, K.; KAWI, S. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix-drug interactions. **Langmuir**, v. 21, p. 9568-9575, 2005.

SOTTOSANTI, J. S. Aesthetic extractions with calcium sulfate and the principles of guided tissue regeneration. **Practical Periodontics and Aesthetic Dentistry**, v. 5, p. 61-69, 1993.

SOUSA, A.; SOUZA, K. C.; SOUSA, E. M. B. Mesoporous silica/apatite nanocomposite: special synthesis route to control local drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 671-679, 2008.

SOUSA, A.; SOUZA, K. C.; REIS, S. C.; SOUSA, R. G.; WINDMOLLER, D.; MACHADO, J. C.; SOUSA, E. M. B. Positron annihilation study of pore size in ordered SBA-15. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, n. 42-44, p. 4800-4805, 2008.

SPICER, P. P.; KRETLOW, J. D.; YOUNG, S.; JANSEN, J. A.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. **Nature Protocols**, v. 7, n. 10, p. 1918-1929, 2012.

STALLMANN, H. P.; FABER, C.; SLOTEMA, E. T.; LYARUU, D. M.; BRONCKERS, A. L. J. J.; AMERONGEN, A. V. N.; WUISMAN, P. I. J. M. Continuous-release or burst-release of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11) from calcium phosphate bone substitutes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 853-855, 2003.

STALLMANN, H. P.; FABER, C.; BRONCKERS, A. L. J. J.; AMERONGEN, A. V. N.; WUISMAN, P. I. J. M. In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 7, p. 18-25, 2006.

STRÖMBERG, C. N.; HERBERTS, P.; PALMERTZ, B. Cemented revision hip arthroplasty - a multicenter 5-9-year study of 204 first revisions of loosening. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 63, p. 111-119, 1992.

SUN, Y. Q.; ASHHURST, D. E. Osteogenic growth peptide enhances the rate of fracture healing in rabbits. **Cell Biology International**, v. 22, n. 4, p. 313-319, 1998.

TAKADAMA, H.; KOKUBO, T. In vitro evaluation of bone bioactivity. In: KOKUBO, T. (Ed.). **Bioceramics and their clinical applications**. Cambridge: Woodhead; Boca Raton: CRC, 2008. Chap. 7, p. 165-182.

TAKADAMA, H.; KIM, H.-M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Mechanism of biomineralization of apatite on a sodium silicate glass: TEM-EDX study in vitro. **Chemistry of Materials**, v. 13, p. 1108-1113, 2001.

TAKADAMA, H.; KIM, H.-M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. X-ray photoelectron spectroscopy study on the processo of apatite formation on a sodium silicate glass in simulated body fluid. **Journal of American Ceramic Society**, v. 85, p. 1933-1936, 2002.

TAKAGI, S.; CHOW, L. C.; ISHIKAWA, K. Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements. **Biomaterials**, v. 19, p. 1593-1599, 1998.

TAKEMASA, R.; KIYASU, K.; TANI, T.; INOUE, S. Validity of calcium phosphate cement vertebroplasty for vertebral non-union after osteoporotic fracture with middle column involvement. **Spine Journal**, v. 7, n. 1, p. 148-155, 2007.

TANG, W.; POLICASTRO, G. M.; HUA, G.; GUO, K.; ZHOU, J.; WESDEMIOTIS, C.; DOLL, G. L.; BECKER, M. L. Bioactive surface modification of metal oxides via catechol-bearing modular peptides: multivalent binding, surface retention, and peptide bioactivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 46, p. 16357-16367, 2014.

THOMAS, M. V.; PULEO, D. A. Calcium sulfate: properties and clinical applications. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B**, v. 88, n. 2, p. 597-610, 2009.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v. 271, n. 1, p. 69-77, 1992.

TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 25, p. 197-205, 1999.

TSAL, C. H.; LIN, R. M.; JU, C. P.; LIN, J. H. C. Bioresorption behavior of tetracalcium phosphate-derived calcium phosphate cement implanted in femur of rabbits. **Biomaterials**, v. 29, n. 8, p. 984-993, 2008.

TUNG, I. C. In vitro drug release of antibiotic-loaded porous hydroxyapatite cement. **Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 81-88, 1995.

TURNER, T. M.; URBAN, R. M.; HALL, D. J.; CHYE, P. C.; SEGRETÍ, J.; GITELIS, S. Local and systemic levels of tobramycin delivered from calcium sulfate bone graft substitute pellets. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 437, p. 97-104, 2005.

UMEGAKI, K.; FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. **Mutagenesis**, v. 15, p. 261-269, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (Brasil). V. C. Pandolfelli; I. R. Oliveira; H. L. Rossetto; M. Jacobovitz. **Composição a base de cimento aluminoso para aplicações em endodontia e produto cimentício obtido**. PI 0704502-6, 27 nov. 2007, 21 jul. 2009.

URABE, K.; NARUSE, K.; HATTORI, H.; HIRANO, M.; UCHIDA, K.; ONUMA, K.; PARK, H. J.; ITOMAN, M. In vitro comparison of elution characteristics of vancomycin from calcium phosphate cement and polymethylmethacrylate. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 14, n. 6, p. 784-793, 2009.

URBAN, R. M.; TURNER, T. M.; HALL, D. J.; INOUE, N.; GITELIS, S. Increased bone formation using calcium sulfate-calcium phosphate composite graft. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 459, p. 110-117, 2007.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 698, p. 893-899, 1965.

VALLET-REGÍ, M.; VILLAREJO, A. L. D. **Liberación de fármacos en matrices biocerámicas**: avances y perspectivas. Madrid: Realigraf, 2006.

VALLET-REGÍ, M.; PÉREZ-PARIENTE, J.; IZQUIERDO-BARBA, I.; SALINAS, A. J. Compositional variations in the calcium phosphate layer growth on gel glasses soaked in a simulated body fluid. **Chemistry of Materials**, v. 12, p. 3770-3776, 2000.

VALLET-REGÍ, M.; RUIZ-GONZÁLEZ, L.; IZQUIERDO-BARBA, I.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Revisiting silica based ordered mesoporous materials: medical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, p. 26-31, 2006.

VALLET-REGÍ, M.; BALAS, F.; COLILLA, M.; MANZANO, M. Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 163-191 2008.

VAN de WATERING, F. C.; VAN de BEUCKEN, J. J.; WALBOOMERS, X. F.; JANSSEN, J. A. Calcium phosphate/poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) composite bone substitute materials: evaluation of temporal degradation and bone ingrowth in a rat critical-sized cranial defect. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, p. 151-159, 2012.

VAN den VREKEN, N. M. F.; CANCK, E. D.; IDE, M.; LAMOTE, K.; VAN der VOORT, P.; VERBEECK, M. H. Calcium phosphate cements modified with pore expanded SBA-15 materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 14502-14509, 2012.

VANCE, G. S.; GREENWELL, H.; MILLER, R. L.; HILL, M.; JOHNSTON, H.; SCHEETZ, J. P. Comparison of an allograft in an experimental putty carrier and a bovine-derived xenograft used in ridge preservation: a clinical and histologic study in humans. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 19, p. 491-497, 2004.

VANELLA, L.; KIM, D. H.; ASPRINIO, D.; PETERSON, S. J.; BARBAGALLO, I.; VANELLA, A.; GOLDSTEIN, D.; IKEHARA, S.; KAPPAS, A.; ABRAHAM, N. G. HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. **Bone**, v. 46, n. 1, p. 236-243, 2010.

VINU, A.; HOSSAIN, K. Z.; ARIGA, K. Recent advances in functionalization of mesoporous sílica. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, p. 347-371, 2005.

XIA, Z.; GROVER, L. M.; HUANG, Y.; ADAMOPOULOS, I. E.; GBURECK, U.; TRIFFITT, J. T.; SHELTON, R. M.; BARRALET, J. E. In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line. **Biomaterials**, v. 27, p. 4557-4565, 2006.

WALSH, W. R.; MORBERG, P.; YU, Y.; YANG, J. L.; HAGGARD, W.; SHEATH, P. C.; SVEHLA, M.; BRUCE, W. J. Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 406, p. 228-236, 2003.

WANG, J.; QIAO, P.; DONG, L.; LI, F.; XU, T.; XIE, Q. Microencapsulated rBMSCs/calcium phosphate cement for bone formation in vivo. **Biomedical Materials and Engineering**, v. 24, n. 1, p.835-843, 2014.

WELCH, R. D.; ZHANG, H.; BRONSON, D. G. Experimental tibial plateau fractures augmented with calcium phosphate cement or autologous bone graft. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85A, n. 2, p. 222-231, 2003.

WENISCH, S.; STAHL, J. P.; HORAS, U.; HEISS, C.; KILIAN, O.; TRINKAUS, K.; HILD, A.; SCHNETTLER, R. In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 67, n. 3, p. 713-718, 2003.

WHEELER, S. L. Eight-year clinical retrospective study of titanium plasma-sprayed and hydroxyapatite-coated cylindrical implants. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 11, n. 3, p. 340-350, 1996.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from airicular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2007.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.

WOO, B. H.; FINK, B. F.; PAGE, R.; SCHRIER, J. A.; JO, Y. W.; JIANG, G.; DELUCA, M.; VASCONEZ, H. C.; DELUCA, P. P. Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 747-1753, 2001.

WOZNEY, J. M.; SEEHERMAN, H. J. Protein-based tissue engineering in bone and cartilage repair. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 392-398, 2004.

YAN, X.; HUANG, X.; YU, C.; DENG, H.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; QIAO, S.; LU, G.; ZHAO, D. The in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses. **Biomaterials**, v. 27, p. 3396-3403, 2006.

YU, L.; LI, Y.; ZHAO, K.; TANG, Y.; CHENG, Z.; CHEN, J.; ZANG, Y.; WU, J.; KONG, L.; LIU, S.; LEI, W.; WU, Z. A novel injectable calcium phosphate cement–bioactive glass composite for bone regeneration. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0062570.

ZERBO, I. R.; BRONCKERS, A. L.; LANGE, G. L.; VAN BEEK, G. J.; BURGER, E. H. Histology of human alveolar bone regeneration with a porous tricalcium phosphate: a report of two cases. **Clinical Oral Implants Research**, v. 12, n. 4, p. 379-384, 2001.

ZHANG, J.; CHEN, S. G.; HABAERXI, K.; ALIMUJIANG, S.; CHEN, Y.; PENG, M. Z.; YUE, R.; WU, Y. L.; WANG, D. Q.; CHEN, Y. M. Reinforcing effect of calcium sulfate cement bovine bone morphogenetic protein on vertebral in the rabbit model of osteoporosis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 5, p. 382-385, 2014.

ZHANG, M.; LI, X. H.; GONG, Y. D.; ZHAO, N. M.; ZHANG, X. F. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. **Biomaterials**, v. 23, p. 2641-2648, 2002.

ZHANG, Z.; WANG, L.; WANG, J.; JIANG, X.; LI, X.; HU, Z.; JI, Y.; WU, X.; CHEN, C. Mesoporous silica-coated gold nanorods as a light-mediated multifunctional theranostic platform for cancer treatment. **Advanced Materials**, v. 24, n. 11, p. 1418-1423, 2012.

ZHAO, D.; HUO, Q.; FENG, J.; CHMELKA, B. F.; STUCKY, G. D. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 120, p. 6024-6036, 1998.

ZHAO, L.; YAN, X.; ZHOU, X.; ZHOU, L.; WANG, H.; TANG, J.; YU, C. Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, p. 210-215, 2008.

ANEXO 1

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 31/2012

Interessada: LARISSA SOUZA MENDES

Orientador: Prof^aDr^a Ana Maria Minarelli Gaspar

Projeto: Vitro-cerâmica mesoporosa bioativa injetável funcionalizada com peptídeo osteogênico para regeneração óssea

Parecer nº 51/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Vitro-cerâmica mesoporosa bioativa injetável funcionalizada com peptídeo osteogênico para regeneração óssea”, apresentado pela pós-graduanda LARISSA SOUZA MENDES, sob orientação da Professora Doutora Ana Maria Minarelli Gaspar, desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em OUTUBRO de 2015, em formulário para este fim.

Araraquara, 21 de setembro de 2012.



Prof.Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

ANEXO 2

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 31/2012

Pesquisadora: LARISSA SOUZA MENDES

Orientadora: Ana Maria Minarelli Gaspar

Projeto: Vitro-cerâmica mesoporosa bioativa injetável funcionalizada com peptídeo osteogênico para regeneração óssea

Parecer nº 06/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 19 de dezembro 2014, analisou e aprovou o pedido de alteração do protocolo para uso de animais na pesquisa “Vitro-cerâmica mesoporosa bioativa injetável funcionalizada com peptídeo osteogênico para regeneração óssea”, apresentado pela pós-graduanda LARISSA SOUZA MENDES, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. ANA MARIA MINARELLI GASPAR do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FO/Ar).

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JANEIRO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 12 de janeiro de 2015.


Prof^ª Dr^ª ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Vice-coordenadora da CEUA