

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor
(a), o texto completo desta tese será
disponibilizado a partir de

19/08/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

HANNA FLAVIA SANTANA DOS SANTOS

**INTERAÇÕES BIOLÓGICAS DE CIMENTOS ÓSSEOS A BASE DE
SILICATO DE CÁLCIO COM DIFERENTES SOLUÇÕES
ATIVADORAS: estudo *in vitro* e *in vivo***

2020

HANNA FLAVIA SANTANA DOS SANTOS

INTERAÇÕES BIOLÓGICAS DE CIMENTOS ÓSSEOS A BASE DE SILICATO DE CÁLCIO COM DIFERENTES SOLUÇÕES ATIVADORAS: estudo *in vitro* e *in vivo*

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Estudos microbiológicos e imunológicos relacionados a biomateriais.

Orientadora: Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Santos, Hanna Flavia Santana Dos

Interações biológicas de cimentos ósseos a base de silicato de cálcio com diferentes soluções ativadoras : estudo in vitro e in vivo / Hanna Flavia Santana Dos Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.
87 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos.

1. Biocerâmica. 2. Reparo ósseo. 3. Diferenciação osteoblástica. 4. Biofilme. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de , orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profª Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profª Assoc. Renata Falchete do Prado

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

André Diniz Rosa da Silva

Academia da Força Aérea (AFA)

Subseção de Apoio ao Ensino da Secretaria da Divisão

Pirassununga

São José dos Campos, 19 de fevereiro de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Adriana Moreira de Santana** e **Flávio Malaquias dos Santos**, por todo aprendizado que me transferiram ao longo da minha vida, pelo suporte, dedicação e carinho. Todas as minhas conquistas dedico a vocês, pois sem os valores essenciais, como respeito e responsabilidade, que me ensinaram eu não conquistaria nada.

Ao **João Rafael Herreira** que foi em todos os momentos meu suporte para conquistar meus objetivos, com muita paciência e amor, me incentivou. Sua companhia contribuiu para que minha jornada fosse mais calma e branda. Sou grata pela sua compreensão com as minhas horas de ausência.

Dedico este trabalho de pesquisa a minha amiga **Daphne de Camargo Reis Mello** que foi uma fonte inesgotável de apoio técnico durante todo o processo. Obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu pai Celestial, que esteve do meu lado em todos os momentos me protegendo e guiando meus passos, seus planos são incríveis e eu em momento nenhum poderia deixar de exaltar sua importância em minha vida.

Aos meus pais por todo o suporte que me deram, são extremamente importantes em minha vida.

A minha grande família, minhas tias e tios, que estão no meu coração e agradeço por existirem.

Ao meu companheiro e amigo que secou minhas lágrimas, que me ouviu e além de tudo me ajudava a abstrair problemas que pareciam tão grandes e que na verdade eram pequenos demais para importância que eu os dava.

Agradeço imensamente ao apoio da minha companheira de laboratório que me ensinou tudo que eu precisei para desenvolver esse trabalho com muito zelo e paciência, Daphne, você tecnicamente e psicologicamente foi uma figura essencial na minha jornada. Pude aprender muito mais que protocolos com você, minha eterna gratidão.

À Renata Ribas agradeço à dedicação, atenção e paciência por me ajudar ao longo do projeto respondendo prontamente às minhas dúvidas de maneira clara e coesa, com muita paciência e afeto. Agradeço ao laço que criamos, com certeza tudo seria muito mais difícil sem você.

À Keila que esteve presente em minha vida desde muito antes do processo seletivo e que eu tive imensa gratidão em ter me aproximado, tornou-se alguém que eu quero ter ao meu lado como amiga para todas as outras jornadas.

A Simone Biazzi de Lapena que foi um anjo que a UNESP me deu de presente, minha mãe de coração, alegrou muito meu ano de 2018, foi minha companheira nos créditos e nos trabalhos desenvolvidos em nosso primeiro ano na instituição. Obrigada pelos conselhos, caronas, críticas e por ter me ajudado a evoluir como profissional e como pessoa. Você foi um anjo de luz!

Aos meus amigos da salinha que tenho profunda gratidão, ajudaram a minha jornada a ter muito amor e sorrisos. Keila, Jaqueline, Anderson, Nayara, Bruna,

Renata, Cheyenne e Noala obrigada por fazerem parte da minha jornada, com certeza vocês foram essenciais no meu dia-a-dia.

Aos meus colegas que tive imenso prazer de conhecer. Mariana, Marianne, Suellen, Lígia, Juliani, Carla, Karen, Felipe, Maíra, Evelin, Rodnei, Pâmela, Thais C, Thais, Liliane, Jessica, Lívia, Patrícia, Taciano e Raquel.

Agradeço a equipe técnica, em especial ao Toninho que meu deu grande suporte no Biotério. À Carla, Walter, Salete, Ana Lourdes, André, Sérgio e Domingos.

À Carol, veterinária responsável pelo biotério.

Aos animais que foram utilizados para que a pesquisa fosse realizada, pois cada um representa uma vida.

À professora Renata Falchete do Prado que contribui na minha vida acadêmica desde 2017, com muita inteligência e dedicação.

À Profa. Associada Luana, pela dedicação, pela amizade e pela paciência sempre. Por ter sido uma orientadora flexível, atenciosa, compreensiva, comunicativa, resolutiva, prestativa e por sua extrema competência. Meu carinho, por você, principalmente por ter me acolhido de braços abertos confiando em mim. Sem você, eu não estaria aqui e nada disso teria sentido. Gratidão define.

Ao professor Ivan de bioestatística que foi peça fundamental para o desenvolvimento dos resultados, me explicou com detalhes e me ajudou a criar o raciocínio necessário para desenvolvimento da dissertação. Obrigada pela atenção e pelas horas que se dispôs a me ajudar.

Aos colegas da UNIP que me deram apoio durante o ano de 2019, em especial a Viviane Bório, Vivian Hyodo, Bruno Costa, Flávia Vilaça, Wendel Simões, Aline Neves, Adriano Moraes, Fernanda Tomé, Fernanda Siqueira e Ana Luiza.

A toda equipe da portaria, em especial ao Gilson e ao Renato, à equipe de serviços gerais pela simpatia e educação.

E a toda equipe do LAPP, em especial a Professora Marianne Spalding, pelo desenvolvimento profissional adquirido em todos eventos coordenados pelo laboratório e toda experiência adquirida.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Associada Luciane Dias Oliveira.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e na orientação das normas.

Ao Laboratório de Biotecnologia do ITA pelo desenvolvimento dos materiais e suporte, especialmente a Renata Ribas, Gilmar, Thiago Moreira e à Thais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Concessão de Bolsa CAPES/FAPESP – 88882.441646/2019-01 com vigência de 01/03/2018 a 29/02/2019.

Sobretudo, acredito que eu tenho muito a agradecer por tudo que vivi e aprendi!

Minha eterna gratidão ao ICT, à Unesp, aos colegas que fiz e aos amigos que ficarão, sobretudo, às experiências vividas que agregaram e me fizeram evoluir!

“Water does not resist. Water flows. When you plunge your hand into it, all you feel is a caress. Water is not a solid wall, it will not stop you. But water always goes where it wants to go, and nothing in the end can stand against it. Water is patient. Dripping water wears away a stone. Remember that, my child. Remember you are half water. If you can't go through an obstacle, go around it. Water does.” — Margaret Atwood, The Penelopiad

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Aspectos éticos	20
3.2 Confeção e caracterização dos cimentos	20
3.2.1 Análise de superfície com microscopia eletrônica de varredura.....	24
3.3 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	25
3.3.1 Cultura celular	25
3.3.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)	28
3.3.3 Conteúdo de proteína total	29
3.3.4 Atividade de fosfatase alcalina	30
3.3.5 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização	30
3.3.6 Análise da morfologia celular por fluorescência direta	32
3.3.7 Avaliação da formação de biofilme microbianos	32
3.4 Ensaios <i>in vivo</i>	34
3.4.1 Procedimento cirúrgico	34
3.4.2 Análise histológica.....	37
3.4.3 Análise histomorfométrica	38
3.4.4 Teste de flexão de três pontos	38
3.5 Análise estatística	40
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Topografia superficial dos cimentos	42
4.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)	44
4.3 Conteúdo de proteína total	46
4.4 Atividade de fosfatase alcalina	47
4.5 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização	49

4.6 Morfologia celular por fluorescência direta	53
4.7 Formação de biofilme.....	54
4.7.1 Biofilme monotípico de <i>C. albicans</i>	54
4.7.2 Biofilme monotípico de <i>S. aureus</i>	55
4.7.3 Biofilme monotípico de <i>P. aeruginosa</i>	56
4.7.4. Comparação de biofilmes monotípicos.....	57
4.8 Análises <i>in vivo</i>	60
4.8.1 Análise histológica.....	60
4.8.2 Análise histomorfométrica	65
4.8.3 Análise da biomecânica	65
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXO.....	87

Santos HFS. Interações biológicas de cimentos ósseos a base de silicato de cálcio com diferentes soluções ativadoras: estudo *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

Os cimentos de silicatos de cálcio (CaSiO_3) podem ser utilizados em tratamentos de reparo ósseo, tanto para aplicações médicas quanto odontológicas. A fim de atender às necessidades da engenharia de tecidos e aprimorar o leque de opções foram produzidos três cimentos de silicatos de cálcio utilizando α -wollastonita como precursora, juntamente com soluções ativadoras com potencial hidrogeniônico neutro, com três diferentes cátions, Na^+ , K^+ e NH_4^+ . A topografia superficial dos cimentos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo (MEV-FEG). Estudos *in vitro*, *in vivo*, relacionados a capacidade de interação com microrganismos e testes biomecânicos foram realizados para avaliar a influência de diferentes soluções ativadoras de fosfato e carbonato nos cimentos produzidos. Nos testes *in vitro* foram utilizadas células mesenquimais provenientes de fêmures de ratos. Após períodos pré-determinados foram realizados os testes de viabilidade celular, conteúdo de proteína total (PT), atividade de fosfatase alcalina (ALP) e formação de nódulos de mineralização. Para análise da interação microbiana a formação dos biofilmes monotípicos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foi mensurada. Posteriormente, os cimentos obtidos, a base de silicato de cálcio, foram submetidos ao estudo *in vivo* utilizando 20 ratos *Wistars* que passaram por procedimento cirúrgico para confecção de um defeito crítico de 3,0 mm nas tíbias direita e esquerda. Após a eutanásia, as peças foram submetidas a análise histológica, histomorfométrica e ao teste biomecânico de flexão de três pontos. Os dados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste Anova um e dois fatores, com nível de significância de 5%. Foi possível analisar que nenhum cimento se mostrou citotóxico, e todos permitiram a adesão e proliferação celular. As células em contato com os cimentos e meios de cultura se mostraram metabolicamente ativas pela expressão de proteínas total, porém, o grupo G- NH_4 obteve destaque devido a expressão superior de fosfatase alcalina, demonstrando maior indução de diferenciação celular. Na análise histológica observou-se proliferação óssea em todos os grupos, sem diferença estatística entre os grupos. Na mensuração de força máxima e força de ruptura observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo G- NH_4 e os demais grupos. Sendo assim, o silicato de cálcio produzido com solução ativadora de fosfato de amônio bifásico, na fase α -wollastonita, se mostrou promissor para engenharia de materiais para regeneração tecidual óssea.

Palavras-chave: Biocerâmica. Reparo ósseo. Diferenciação osteoblástica. Biofilme.

Santos HFS. Biological interactions of calcium silicate-based bone cements with different activate solutions: in vitro and in vivo study [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

Calcium silicate cements (CaSiO_3) can be used in bone repair treatments, both for medical and dental applications. In order to meet the needs of tissue engineering and improve the range of options, three calcium silicate cements were produced using α -wollastonite as a precursor, with an activating solution of neutral potential hydrogen ionic, made of three different cations Na^+ , K^+ and NH_4^+ . A superficial topography of the cements was analyzed by Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy (SEM-FEG). In vitro, in vivo studies related to the ability to interact with microorganisms and biomechanical tests were carried out to evaluate the influence of different phosphate and carbonate activating solutions in the cements produced. In in vitro tests, mesenchymal cells from rat femurs were used. After predetermined periods, cell viability tests, total protein content (PT), alkaline phosphatase activity (ALP) and formation of mineralization nodules were performed. For the analysis of microbial interaction, the formation of monotypic biofilms from S. aureus, P. aeruginosa and C. albicans was measured. Subsequently, the obtained cements, based on calcium silicate, were subjected to an in vivo study using 20 Wistars rats that underwent a surgical procedure to make a 3.0 mm critical defect in the right and left tibiae. After euthanasia, the pieces were submitted to histological, histomorphometric analysis and biomechanical flexion test of three points. The data obtained were statistically analyzed by the Anova test, one and two factors, with a significance level of 5%. It was possible to analyze that no cement was shown to be cytotoxic, and all allowed cell adhesion and proliferation. The cells in contact with the cements and culture media were shown to be metabolically active by the expression of total proteins, however, the G-NH_4 group was highlighted due to the superior expression of alkaline phosphatase, demonstrating greater induction of cell differentiation. In the histological analysis, bone proliferation was observed in all groups, with no statistical difference between groups. In measuring the maximum strength and tensile strength it showed a statistically significant difference between the G-NH_4 group and the other groups. Thus, the calcium silicate produced with a biphasic ammonium phosphate activating solution, in the α -wollastonite phase, proved to be promising for engineering materials for bone tissue regeneration.

Keywords: Bioceramics. Bone repair. Osteoblastic differentiation. Biofilm.

1 INTRODUÇÃO

A expectativa de vida global revelou ter passado por mudanças significativas desde o século XX, com o advento tecnológico houve contribuições positivas para melhora das condições de vida e consequentemente da saúde populacional (Camargos et al., 2019; Lima et al., 2016).

Em decorrência do envelhecimento da população, e consequente aumento da expectativa de vida, doenças relacionadas a estrutura óssea tornaram-se um problema de saúde pública, gerando assim, um aumento substancial nas despesas econômicas ligada as fraturas ósseas. Os problemas ósseos geram grandes transtornos ao paciente, além de gastos com o tratamento e diminuição de sua qualidade de vida e bem-estar (Brotto, Bonewald, 2015; Dai, Koh, 2015).

Pesquisas recentes demonstram que fraturas ósseas relacionadas à idade aumentarão nos Estados Unidos e na Europa, estimando-se que cerca de 1 milhão de pessoas sofrerão fraturas anualmente. Consequentemente, os avanços recentes da ciência sobre o papel estrutural, biofísico e bioquímico dos biomateriais, e do tecido ósseo, contribuem para a ascensão de pesquisas sobre cimentos visando a regeneração óssea (Yu et al., 2015). Além de evidenciarem a necessidade eminente do desenvolvimento de novos tratamentos, eficazes e compatíveis para lesões ósseas (Hernlund et al., 2013; Lopes et al., 2018; Quarto, Giannoni, 2016).

A demanda por novos materiais e aprimoramento dos existentes a serem utilizados nas áreas médico-odontológicas é grande, afinal têm-se buscado melhora na qualidade de vida (Guastaldi, Aparecida, 2010). Com isso, a busca por um biomaterial ideal tem sido alvo de pesquisas há várias décadas (Brow, Chow, 1986; de Aza et al., 1996; Kawachi et al., 2000; Pattanayak, 2009; Wu, Chang, 2013; Samavedi et al., 2013; Yu et al., 2015; Aly et al., 2016; Villalpando-Reyna et al., 2019; Wang et al., 2019; Weichhold et al., 2019)

Brown e Chow (1986) desenvolveram o primeiro cimento de fosfato de cálcio. A partir da sua formulação, observaram que a precipitação de finos cristais de hidroxiapatita ocorre devido à dissolução dos fosfatos de cálcio, cujo arranjo proporciona a resistência mecânica do material com diversas utilidades na área

odontológica, especialmente para remineralização óssea. Esses fosfatos de cálcio elaborados por Brown e Chow (1986) apresentaram-se como os principais materiais estudados e empregados para a reposição e regeneração do tecido ósseo em finalidades clínicas. Estes materiais exibem como principais características a semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados, biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, taxas de degradação variáveis e osteocondutividade (Bouler et al., 2017; Guastaldi, Aparecida, 2010; Kawachi et al., 2000; Samavedi et al., 2013).

A formulação de cimento de fosfato tricálcico (TCP) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ patenteado por Brown e Chow (1986) é o mais utilizado, sendo a razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo de 1,5. E podem ocorrer quatro formas alotrópicas (α , α' , β , γ). O β - fosfato tricálcico (β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP) é o mais difundido até hoje, por apresentar bom comportamento mecânico e, principalmente, devido à maior bioatividade em consequência do arranjo estrutural desta fase, possibilitando maior troca de íons, Ca^{2+} e PO_4^{3-} , com o meio biológico (Arbez et al., 2019; Barbosa et al., 2019; Gu et al., 2019; Guastaldi, Aparecida, 2010; Ito et al., 2019; Kakuta et al., 2019; Kawachi et al., 2000; Pitkänen et al., 2019). De acordo com Samavedi et al. (2013) e Guastaldi e Aparecida (2010) o β -TCP foi usado mais extensivamente na regeneração óssea que o α -TCP (Weichhold et al., 2019).

Devido ao seu comportamento biodegradável, o TCP nas formas alotrópicas α e β têm-se tornado objeto de interesse na área de cimentos, sendo utilizado na ortopedia e odontologia como material de preenchimento de cavidades e defeitos ósseos, além da fixação de tecidos moles (Bouler et al., 2017; Guastaldi, Aparecida, 2010). De acordo com Bouler et al. (2017), os cimentos compostos de fosfatos de cálcio e fosfato de cálcio dibásico têm eficácia comprovada em indicações clínicas, pois sua relação HA / TCP regulam a reabsorção progressiva e o processo de substituição óssea (Carrel et al., 2016; Kakar et al., 2017; Kamal et al., 2019; Nery et al., 2017).

Com o advento tecnológico, além da metodologia utilizada por Brown e Chow (1986), outras possibilidades foram encontradas para produzir um cimento ósseo. Por exemplo, o protocolo descrito sobre o processo de dissolução do silicato de cálcio em uma solução de fosfato, precipitando hidroxiapatita e formando um silicato vítreo

descrita por Mosselmans et al. (2007). Esta técnica mostrou que na presença de ácido fosfórico, o silicato de cálcio (CaSiO_3) ou wollastonita, formava um novo material composto por um fosfato de cálcio hidratado (hidroxiapatita) e sílica gel (fase vítrea). A formação dessas fases torna esse material notável, uma vez que ele pode apresentar uma fase cristalina, composta de fosfato de cálcio e uma fase vítrea rica em silício, combinando características de dois materiais muito utilizados para reparação óssea: os TCPs e os biovidros. A fase rica em silício pode apresentar grupos silanóis que são capazes de adsorver proteína e favorecer a adesão celular melhorando a sua bioatividade, como os biovidros, aumentando a sua capacidade de regeneração óssea (Jones, 2012).

No entanto, a produção de cimentos a base de silicato de cálcio para utilização clínica não pode ser usada apenas com a mistura do silicato com ácido fosfórico, devido ao baixo potencial hidrogeniônico (pH) do ácido fosfórico, que danificaria o tecido no qual o biomaterial fosse empregado. Como alternativa de produção do cimento de silicato de cálcio, utiliza-se uma solução tampão (pH $\approx$ 7), composta por ácido fosfórico e uma base a fim de obter uma mistura composta por fosfato e cátions de pH semelhante ao dos tecidos (Jones, 2012).

Analogamente, esse mesmo recurso pode ser usado nos cimentos de silicato de cálcio como uma alternativa para melhorar suas características. O geopolímero é um material com comportamento e processo de obtenção parecido ao cimento de silicato de cálcio. Este material é formado pela condensação de sílica e alumina, formando uma fase vítrea. Ambos são formados por um silicato que ao ser misturado com uma solução ativadora, solução tampão, produz uma reação química de condensação, formando um material coeso. Durante o processo de cura, o geopolímero sofre a influência dos cátions usados na solução ativadora, que mudam o tempo de pega e coesão desses materiais. Após a cura, as variações causadas pela mudança de composição alteram a resistência química e mecânica desses materiais. A alteração das características mecânicas é causada pela alteração no arranjo dos átomos na estrutura vítrea. Já a modificação química, é causada pela formação de ligações que podem alterar sua solubilidade em água, favorecendo a degradação desses materiais. A solução ativadora pode ser usada para controlar a composição do geopolímero influenciando as suas propriedades mecânicas e químicas

(Davidovits, 2015).

Assim, o diferencial do material utilizado no presente estudo, com o α -TCP, é a presença dessa fase vítrea, semelhante ao geopolímero que é um dos fatores que podem determinar a resistência desse material. Em um estudo semelhante foi sintetizado um cimento usando o silicato de cálcio e um tampão de fosfato e amônio e obteve boas características biológicas, tornando-se muito promissor (Ding et al., 2009). Entretanto, mostraram uma resistência inferior quando comparados com os cimentos obtidos por TCP (Ding et al., 2009). Esse resultado pode justificar-se pela falta de uma fase pura de silicato de cálcio e pela composição da solução ativadora, que podem ter influenciado a estrutura química da fase vítrea, resultando na alteração das suas propriedades mecânicas.

Ding et al. (2009) realizaram estudo *in vitro* com células de osteossarcoma humano com cimento de silicato de cálcio com solução de fosfato de amônio, avaliaram a proliferação destas células, bem como a expressão de mRNAs relacionados a osteoblastos. Os autores concluíram que o material além de bioativo, aprimorou a proliferação e diferenciação das células.

Ensaio *in vitro* com células humanas derivadas de ossos também foram realizados com silicato de cálcio e demonstraram resultados positivos. Os autores afirmaram que a modificação da cerâmica com a incorporação de um cátion, além de diminuir o pH do meio, melhorou as propriedades físicas e biológicas da cerâmica pura. Assim, os autores concluíram que a cerâmica (CaSiO_3) pode ser considerada um material com potencial para a regeneração óssea (Wu et al., 2007). De Aza et al. (2013) investigaram o papel do silício dos TCP (α e β) sobre propriedades mecânicas e proliferação de células mesenquimais, bem como, sua diferenciação osteoblástica e mineralização. Os autores concluíram que a incorporação de íons silicatos na cerâmica promoveu processos de remodelação óssea na interface osso / cerâmica, com taxa de solubilidade diminuída.

Outra característica que deve ser considerada é a capacidade de interação do biomaterial com os microrganismos que pode favorecer a formação de biofilme e a ocorrência de infecções, neste caso em tecido ósseo é conhecida como osteomelite. Logo, o combate a infecções provenientes da formação de biofilmes em implantes pode trazer complicações no sucesso do implante (Ford, Cassat, 2017). Biofilmes são

comunidades de microrganismos unidas a uma superfície de grande importância na persistência de infecções Rabin et al. (2015). Os microrganismos dentro de um biofilme exibem várias ordens de grandeza mais resistentes a antibióticos comparadas com bactérias planctônicas (Oliveira et al., 2015; Rabin et al., 2015). Devido a isso, complicações pós-cirúrgicas decorrem da formação de colônias de bactérias na superfície dos implantes. Microrganismos com diferentes características e relevância clínica foram analisados em estudos prévios sobre o potencial antimicrobiano de biomateriais.

Estudos avaliaram o crescimento do biofilme de *Staphylococcus aureus* em cimentos e compósitos com utilização médico-odontológico (El-Wassefy et al., 2018; ElReash et al., 2019; Russo et al., 2019; Zhang et al., 2020). El-Wassefy et al. (2018) concluíram que a incorporação de partículas de prata no cimento limitou a formação do biofilme de *S. aureus*, sem efeito significativo em suas propriedades mecânicas nem influência notável em sua coloração.

ElReash et al. (2019) compararam *in vitro* o efeito antimicrobiano correlacionando com pH de dois cimentos de silicato de cálcio e uma resina. Concluíram que cimentos à base de silicato de cálcio mostram potencial atividade antimicrobiana devido à sua alta alcalinidade e questiona o efeito antimicrobiano de cimentos de silicato de cálcio contra espécies bacterianas estritamente anaeróbicas. Abou ElReash et al. (2019) utilizaram os mesmos cimentos do estudo de ElReash et al. (2019) em modelos animais, e conseguiram demonstrar biocompatibilidade para os tecidos subcutâneos com a utilização do Agregado de Trióxido Mineral (Angelus PR, Brasil), iRoot BP Plus (BioCeramix Inc., Vancouver, BC, Canadá) e Resina Restauradora Bioativa (ACTIVA, MA, Pulpdent, EUA).

Russo et al. (2019) destacaram as características mecânicas, biológicas e antibacterianas contra cepas bacterianas de *P. aeruginosa* e *S. aureus* do cimento cirúrgico modificado. Recentemente Zhang et al. (2020) estudaram cimentos bioativos à base de silicato de cálcio para suprimir infecção, sendo promissor para terapia periapical ou reparo de defeito ósseo alveolar. O potencial antimicrobiano destes cimentos foi testado em cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Concluiu-se que o potencial antibacteriano é apreciável a longo prazo, além de, ter confirmado o aprimoramento da regeneração óssea em defeito ósseo maxilofacial de coelhos.

A *Candida albicans* (Gulati et al., 2016; Willems et al., 2016) tem como mecanismo de resistência a capacidade de formação de biofilmes, sendo muito presente na cavidade oral, com pH médio, com produção de ácido láctico e liberação de cálcio da hidroxiapatita. A espécie foi avaliada quanto seu crescimento microbiano em biomateriais particulados e em superfícies (Villard et al., 2015; Yahia et al., 2017; ElReash et al., 2019). Villard et al. (2015) concluíram que o revestimento de sílica e a silanização modificaram a capacidade do biomaterial estudado em inibir a formação de biofilme de *C. albicans*, e o mesmo comportamento foi observado no estudo realizado por ElReash et al. (2019).

A inibição do crescimento microbiano pode ser justificada devido a influência entre o biomaterial e o microrganismo. Após o contato do cimento de silicato de cálcio com a saliva humana, há formação de uma camada de apatita, resultante da bioatividade do material (Biswas et al., 2018 *apud* Wu, Chang, 2013). Essa interação promove a geração de cargas que são capazes de formar espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente as hidroxilas ($\text{OH}^\cdot$), que de acordo com Samanta et al. (2017) são as principais espécies responsáveis por danos oxidativos a lipídios, proteínas e a parede celular bacteriana. Dessa forma a capacidade antibacteriana, bem como a capacidade de inibir o crescimento de biofilmes, estão relacionadas com a capacidade dos biomateriais de induzirem a formação de ERO.

Tendo em vista a complexidade das propriedades de um cimento, são necessários estudos que abranjam desde o desenvolvimento de um biomaterial até a sua utilização, uma vez que suas implicações em processos biológicos e a toxicidade do biomaterial dependem das suas características físico-químicas (Chatterjee et al., 2014). Dessa forma, é importante salientar que um biomaterial deve, além de promover interações positivas ao sistema biológico no qual é inserido, suas propriedades mecânicas devem ser adequadas. Por isso, a base de silicato tem sido muito explorada, a fim de desenvolver um cimento com propriedades mecânicas e biológicas aperfeiçoadas para utilização em procedimentos odontológicos e ortopédicos.

6 CONCLUSÃO

Por meio dos testes desenvolvidos ao longo deste trabalho, é possível afirmar que o objetivo foi alcançado. Uma vez que foi possível comprovar a influência das diferentes soluções na diferenciação de osteoblastos *in vitro* e neoformação óssea *in vivo*. Ao final, fica explícito que suas composições afetaram tanto a morfologia superficial dos cimentos como a diferenciação celular, a osteogênese e a formação de biofilme.

Em relação a atividade e diferenciação celular pôde-se confirmar que nenhuma delas se mostrou citotóxica, e todas permitiram a adesão e proliferação celular. Ressalta-se que apesar das células quando em contato com os grupos de cimento e meios de cultura se mostraram metabolicamente ativas pela expressão de proteínas total, o grupo G-NH₄ obteve destaque devido a expressão superior de fosfatase alcalina, demonstrando maior influência sobre a diferenciação celular. O grupo G-NH₄ apresentou melhor resultado no teste biomecânico e maior tendência a neoformação óssea.

Sendo assim, o silicato de cálcio produzido com solução ativadora de fosfato de amônio bifásico, na fase α -wollastonita, se mostrou promissor para utilização na regeneração tecidual óssea.

REFERÊNCIAS*

- Abou ElReash A, Hamama H, Abdo W, Wu Q, Zaen El-Din A, Xiaoli X. Biocompatibility of new bioactive resin composite versus calcium silicate cements: an animal study. *BMC Oral Health*. 2019 Aug 22;19(1):194. doi: 10.1186/s12903-019-0887-1.
- Aly IHM, Abed Alrahim Mohammed L, Al-Meer S, Elsaid K, Barakat NAM. Preparation and characterization of wollastonite/titanium oxide nanofiber bioceramic composite as a future implant material. *Ceram Int*. 2016;42:11525-34. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.02.060>.
- Arbez B, Manero F, Mabilieu G, Libouban H, Chappard D. Human macrophages and osteoclasts resorb β -tricalcium phosphate in vitro but not mouse macrophages. *Micron*. 2019 Jul 30;125:102730. doi: 10.1016/j.micron.2019.102730
- Barbosa WT, de Almeida KV, de Lima GG, Rodriguez MA, Lia Fook MV, García-Carrodegua R, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ β -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Aug 8. doi: 10.1002/jbm.b.34462.
- Bartlett MS. Properties of sufficiency and statistical tests. *Proc. R. Soc. Lond.* A160268–282; 1997. <https://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109>
- Bellucci D, Cannillo V, Ciardelli G, Gentile P, Sola A. Potassium based bioactive glass for bone tissue engineering. *Ceramics International*. 2010;36:2449–53. doi:10.1016/j.ceramint.2010.07.009.
- Bellucci D, Sola A, Salvatori R, Anesi A, Chiarini L, Cannillo V. Sol-gel derived bioactive glasses with low tendency to crystallize: synthesis, post-sintering bioactivity and possible application for the production of porous scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Oct;43:573-86. doi: 10.1016/j.msec.2014.07.037.
- Benito N, Franco M, Ribera A, Soriano A, Rodriguez-Pardo D, Sorlí L, et al. Time trends in the a etiology of prosthetic joint infections: a multicentre cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Aug;22(8):732.e1-8. doi: 10.1016/j.cmi.2016.05.004.
- Biswas N, Samanta A, Podder S, Ghosh CK, Ghosh J, Das M, et al. Phase pure, high hardness, biocompatible calcium silicates with excellent anti-bacterial and biofilm inhibition efficacies for endodontic and orthopaedic applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018 Oct;86:264-83. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.06.046.
- Brotto M, Bonewald L. Bone and muscle: Interactions beyond mechanical. *Bone*. 2015 Nov;80:109-14. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.010.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bouler JM, Pilet P, Gauthier O, Verron E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomaterialia*. 2017;53:1–12. doi:10.1016/j.actbio.2017.01.076

Brown MB, Forsythe AB. Robust tests for the equality of variances. *Journal of the American Statistical Association*. 1974;69: 364–67. doi:10.1080/01621459.1974.10482955

Brown WE, Chow LC. A New Calcium Phosphate, Water-setting Cement. *Cem Res Prog*. 1986;352-379. doi: 10.1155/2012/809235

Camargos MCS, Gonzaga MR, Costa JV, Bomfim WC. Disability-free life expectancy estimates for Brazil and Major Regions, 1998 and 2013. *Cien Saude Colet*. 2019;24(3):737-47. doi:10.1590/1413-81232018243.07612017

Carpenter JW. *Formulário de Animais Exóticos*. 3. ed. São Paulo: Editora MedVet; 2010.

Carolina M, Herrera M, Flores-ledesma A, Humberto F, Santana B. Microleakage in MTA-type dental cement modified with wollastonite and bioactive glass. *Revista Odont Mexi*. 2018;22(1):34–8.

Carrel JP, Wiskott A, Moussa M, Rieder P, Scherrer S, Durual S. A 3D printed TCP/HA structure as a new osteoconductive scaffold for vertical bone augmentation. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Jan;27(1):55-62. doi: 10.1111/clr.12503.

Cerruti M, Sahai N. Silicate Biomaterials for Orthopaedic and Dental Implants. *Rev Mineral Geochemistry*. 2006;64(1):283–313. Disponível em: <https://doi.org/10.2138/rmg.2006.64.9>.

Chatterjee K, Sarkar S, Jagajjanani Rao K, Paria S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014;209:8-39. doi:10.1016/j.cis.2013.12.008

Chen QZ, Thouas GA. Fabrication and characterization of sol-gel derived 45S5 Bioglass®-ceramic scaffolds. *Acta Biomater*. 2011;7(10):3616–26. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.005>.

Cozza N, Monte F, Bonani W, Aswath P, Motta A, Migliaresi C. Bioactivity and mineralization of natural hydroxyapatite from cuttlefish bone and Bioglass(®) co-sintered bioceramics. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Feb;12(2):e1131-e1142. doi:10.1002/term.2448.

Dai Z, Koh WP. B-vitamins and bone health - a review of the current evidence. *Nutrients*. 2015 May 7;7(5):3322-46. doi: 10.3390/nu7053322.

Davidovits J. *Geopolymer Chemistry and Applications*. 4th ed. Saint-Quentin (France): Institut Géopolymère; 2015.

De Andrade DP, De Vasconcellos LMR, Silva Carvalho IC, De Brito Penna Forte LF, De Souza Santos EL, Do Prado RF, et al. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. *Mater Sci Eng. C.* 2015;56:538–44. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.026.

de Aza PN, Luklinska ZB, Anseau M, Guitian F, de Aza S. Morphological studies of pseudowollastonite for biomedical application. *J Microsc.* 1996;182(1):24–31.

de Aza PN, Luklinska ZB, Mate-Sanchez de Val JE, Calvo-Guirado JL. Biodegradation process of α -tricalcium phosphate and α -tricalcium phosphate solid solution bioceramics in vivo: a comparative study. *Microsc Microanal.* 2013;19(5):1350-1357. doi:10.1017/S1431927613001864

Dimitriev Y, Ivanova Y, Iordanova R. History of Sol-Gel Science and Technology. *Chem Inform.* 2009; 40:181–92. doi:10.1002/chin.200912249.

Ding S-J, Shie M-Y, Wang C-Y. Novel fast-setting calcium silicate bone cements with high bioactivity and enhanced osteogenesis in vitro. *J. Mater. Chem.* 2009;19(8):1183-1190. doi: 10.1039/B819033J.

ElReash AA, Hamama H, Eldars W, Lingwei G, Zaen El-Din AM, Xiaoli, X. Antimicrobial activity and pH measurement of calcium silicate cements versus new bioactive resin composite restorative material. *BMC Oral Health.* 2019;19(1). doi:10.1186/s12903-019-0933-z

El-Wassefy NA, El-Mahdy RH, El-Kholany NR. The impact of silver nanoparticles integration on biofilm formation and mechanical properties of glass ionomer cement. *J Esthet Restor Dent.* 2018 Mar;30(2):146-52. doi: 10.1111/jerd.12353.

Esteban R, Ariz I, Cruz C, Moran JF. Review: Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Sci.* 2016 Jul;248:92-101. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.04.008.

Falkinham JO 3rd, Hilborn ED, Arduino MJ, Pruden A, Edwards MA. Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Health Perspect.* 2015 Aug;123(8):749-58. doi: 10.1289/ehp.1408692.

Faure J, Drevet R, Lemelle A, Ben Jaber N, Tara A, El Btaouri H, et al. A new sol-gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst. *Mater Sci Eng. C.* 2015;47:407–12. doi: 10.1016/j.msec.2014.11.045.

Ford CA, Cassat JE. Advances in the local and targeted delivery of anti-infective agents for management of osteomyelitis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017 Sep;15(9):851-60. doi: 10.1080/14787210.2017.1372192.

Gandolfi MG, Ciapetti G, Taddei P, Perut F, Tinti A, Cardoso MV, et al. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dent Mater.*

2010;26(10):974-92. doi:10.1016/j.dental.2010.06.002

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *An Bioch.* 2004;329:77–84. doi: 10.1016/j.ab.2004.02.002.

Gu Y, Zhang J, Zhang X, Liang G, Xu T, Niu W. Three-dimensional Printed Mg-Doped β -TCP Bone Tissue Engineering scaffolds: Effects of Magnesium Ion Concentration on Osteogenesis and Angiogenesis In Vitro. *Tissue Eng Regen Med.* 2019 Jun 17;16(4):415-29. doi: 10.1007/s13770-019-00192-0.

Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como cimentos, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim Nova.* 2010;33(6):1352–8.

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016 May;18(5):310-21. doi:10.1016/j.micinf.2016.01.002.

Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos.* 2013;8(1-2):136. doi: 10.1007/s11657-013-0136-1.

Hoeman, CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathologie Biologie.* 2009;57(4): 318–23. doi:10.1016/j.patbio.2009.06.004

Hoerth RM, Seidt BM, Shah M, Schwarz C, Willie BM, Duda GN, et al. Mechanical and structural properties of bone in non-critical and critical healing in rat. *Acta Biomater.* 2014 Sep;10(9):4009-19. doi: 10.1016/j.actbio.2014.06.003. Epub 2014 Jun 12. PubMed PMID: 24929204.

Hu D, Li K, Xie Y, Pan H, Zhao J, Huang L, et al. Different response of osteoblastic cells to Mg(2+), Zn(2+) and Sr(2+) doped calcium silicate coatings. *J Mater Sci Mater Med.* 2016 Mar;27(3):56. doi: 10.1007/s10856-016-5672-y.

Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials.* 2016;81:58-71. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.12.012

Irie DL. *Síntese e Caracterização do Cimento Ósseo a Base de α -Wollastonita* [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2017.

Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 2012;9(August):4457–86. doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.023.

Kakar A, Rao BHS, Hegde S, Deshpande N, Lindner A, Nagursky H, et al. Ridge preservation using an in situ hardening biphasic calcium phosphate (β -TCP/HA) bone graft substitute-a clinical, radiological, and histological study. *Int J Implant Dent*. 2017 Dec;3(1):25. doi: 10.1186/s40729-017-0086-2.

Kakuta A, Tanaka T, Chazono M, Komaki H, Kitasato S, Inagaki N, et al. Effects of micro-porosity and local BMP-2 administration on bioresorption of β -TCP and new bone formation. *Biomater Res*. 2019 Jul 26;23:12. doi: 10.1186/s40824-019-0161-2.

Kamal M, Andersson L, Al-Asfour A, Bartella AK, Gremse F, Rosenhain S, et al. Bone regeneration in rabbit calvarial critical-sized defects filled with composite in situ formed xenogenic dentin and biphasic tricalcium phosphate/hydroxyapatite mixture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Apr;107(3):773-82. doi: 10.1002/jbm.b.34171.

Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*. 2004 Dec 7;8:37-57. Review. PubMed PMID: 15593018.

Kawachi YE, Bertran AC, Reis RR, Alves LO. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*. 2000; 23(4): 518-22. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000400015>.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother*. 2010;1(2):94-9. doi:10.4103/0976-500X.72351.

Kim SK, Lee JH. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol*. 2016 Feb;54(2):71-85. doi: 10.1007/s12275-016-5528-7. Epub 2016 Feb 2. Review. PubMed PMID: 26832663.

Klein LC. Sol-gel processing. *Ann Rev Mater Sci*. 1985;15:227-48.

Landis WJ. Mineral characterization in calcifying tissues: Atomic, molecular and macromolecular perspectives. *Connect Tissue Res*. 1996;35:1-8.

Lima MG, Belon AP, Barros MB. Happy life expectancy among older adults: differences by sex and functional limitations. *Rev Saude Publica*. 2016;50(0):64. doi:10.1590/S1518-8787.2016050006727

Limo MJ, Sola-Rabada A, Boix E, Thota V, Westcoot ZC, Puddu V, et al. Interactions between Metal Oxides and Biomolecules: from Fundamental Understanding to Applications. *Chem Rev*. 2018;118(22):11118-93. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00660

Liu J, Li J, Ye J, He F. Setting behavior, mechanical property and biocompatibility of anti-washout wollastonite/calcium phosphate composite cement. *Ceram. Int*. 2016;42(12):13670-81. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.05.165>.

Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*. 2018 Dec;185:240-75. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.028

Lopes JH, Magalhães JA, Gouveia RF, Bertran CA, Motisuke M, Camargo SEA, et al. Hierarchical structures of β -TCP/45S5 bioglass hybrid scaffolds prepared by gelcasting. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016 Sep;62:10-23. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.04.028.

Lowry HO, Rosebrough JN, Lewis A, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Readings*. 1951;193(1):265–275.

Mehrjou B, Mo S, Dehghan-Baniani D, Wang G, Qasim AM, Chu PK. Antibacterial and cytocompatible nanoengineered silk-based materials for orthopedic implants and tissue engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 Aug 6. doi: 10.1021/acsami.9b09066.

Mello DCR, de Oliveira JR, Cairo CAA, Ramos LSB, Vegian MRDC, de Vasconcellos LGO, et al. Titanium alloys: in vitro biological analyzes on biofilm formation, biocompatibility, cell differentiation to induce bone formation, and immunological response. *J Mater Sci Mater Med*. 2019;30(9):108. Published 2019 Sep 18. doi:10.1007/s10856-019-6310-2

Moazzami SM, Sadid Zadeh R, Kianoush K, Sarmad M, Barani Karbaski F, Amiri Daluyi R, et al. Chemical Stability of Bioglass in Simulated Oral Environment. *J Dent Biomater*. 2016 Sep;3(3):261-8. PMID: 28959752; PMCID: PMC5608061.

Mosselmans G, Biesemans M, Willem R, Wastiels J, Leermakers M, Rahier H, et al. Thermal hardening and structure of a phosphorus containing cementitious model material: PPP Phosphoric acid-wollastonite. *J Therm Anal Calorim*. 2007;88(3):723–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10973-006-8225-7>.

Motisuke M, Santos VR, Bazanini NC, Bertran CA. Apatite bone cement reinforced with calcium silicate fibers. *J Mater Sci Mater. Med*. 2014;25(10):2357–63. DOI: 10.1007/s10856-014-5280-7.

Müller WEG, Tolba E, Schröder HC, Muñoz-Espí R, Diehl-Seifert B, Wang X. Amorphous polyphosphate-hydroxyapatite: A morphogenetically active substrate for bone-related SaOS-2 cells in vitro. *Acta Biomater*. 2016;31:358-67. doi:10.1016/j.actbio.2015.11.060

Nery JC, Pereira LAVD, Guimarães GF, Scardueli CR, França FMG, Spin-Neto R, et al. β -TCP/HA with or without enamel matrix proteins for maxillary sinus floor augmentation: a histomorphometric analysis of human biopsies. *Int J Implant Dent*. 2017 Dec;3(1):18. doi: 10.1186/s40729-017-0080-8.

Nothdurft FP, Fontana D, Ruppenthal S, May A, Aktas C, Mehraein Y, et al. Differential Behavior of Fibroblasts and Epithelial Cells on Structured Implant Abutment Materials: A Comparison of Materials and Surface Topographies. *Clin*

Implant Dent Relat Res. 2015 Dec;17(6):1237-49. doi:10.1111/cid.12253.

Oliveira NM, Martinez-Garcia E, Xavier J, Durham WM, Kolter R, Kim W, et al. Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. PLoS Biol. 2015 Jul 9;13(7):e1002191. doi: 10.1371/journal.pbio.1002191.

Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. Biomaterials. 2004 Feb;25(3):403-13.

Pan Y, Yin J, Yao D, Zuo K, Xia Y, Liang H, et al. Effects of silica sol on the microstructure and mechanical properties of CaSiO₃bioceramics. Mater Sci Eng C. 2016;64:336–340. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.109>.

Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 2019;37(1):177-92. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013

Pattanayak DK. Apatite wollastonite-poly methyl methacrylate bio-composites. Mater. Sci Eng C. 2009;29(5):1709–14. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.019>.

Pierre AC. Introduction to Sol-Gel Processing. Boston: Springer US; 1998. doi:10.1007/978-1-4615-5659-6.

Pitkänen S, Paakinaho K, Pihlman H, Ahola N, Hannula M, Asikainen S, et al. Characterisation and in vitro and in vivo evaluation of supercritical-CO₂-foamed β -TCP/PLCL composites for bone applications. Eur Cell Mater. 2019 Aug 5;38:35-50. doi: 10.22203/eCM.v038a04.

Prado FA, Ambinder AL, Jaime APG, Lima AP, Balducci I, Rocha RF. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. Rev Odontol UNICID. 2006;18(1):7-13.

Quarto R, Giannoni P. Bone Tissue Engineering: Past-Present-Future. Methods Mol Biol. 2016;1416:21-33. doi: 10.1007/978-1-4939-3584-0_2.

Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Med Chem. 2015;7(4):493-512. doi: 10.4155/fmc.15.6.

Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2001;18(4):163-70.

Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. Biomed Res Int. 2015;2015:759348. doi:10.1155/2015/759348

Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RHC, Oliveira PT, Rosa AL. Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol*. 2008;28(2):205-11. doi: 10.1002/jat.1271.

Russo T, De Santis R, Gloria A, Barbaro K, Altigeri A, Fadeeva IV, et al. Modification of PMMA Cements for Cranioplasty with Bioactive Glass and Copper Doped Tricalcium Phosphate Particles. *Polymers (Basel)*. 2019 Dec 25;12(1). pii: E37. doi: 10.3390/polym12010037. PubMed PMID: 31881672.

Samanta A, Podder S, Ghosh CK, Bhattacharya M, Ghosh J, Mallik AK, et al. ROS mediated high anti-bacterial efficacy of strain tolerant layered phase pure nano-calcium hydroxide. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017 Aug;72:110-28. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.04.004.

Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater*. 2013;9(9):8037-45. doi:10.1016/j.actbio.2013.06.014

Shao H, Sun M, Zhang F, Liu A, He Y, Fu J, et al. Custom Repair of Mandibular Bone Defects with 3D Printed Bioceramic scaffolds. *J Dent Res*. 2018;97(1):68–76. doi: 10.1177/0022034517734846

Sista S, Wen C, Hodgson PD, Pande G. The influence of surface energy of titanium-zirconium alloy on osteoblast cell functions in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2011;97(1):27-36. doi:10.1002/jbm.a.33013

Turlybekuly A, Pogrebnjak AD, Sukhodub LF, Sukhodub LB, Kistaubayeva AS, Savitskaya IS, et al. Synthesis, characterization, in vitro biocompatibility and antibacterial properties study of nanocomposite materials based on hydroxyapatite-biphasic ZnO micro- and nanoparticles embedded in Alginate matrix. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Nov;104:109965. doi: 10.1016/j.msec.2019.109965.

Uvin P, Everaerts W, Pinto S, Alpízar YA, Boudes M, Gevaert et al. The use of cystometry in small rodents: a study of bladder chemosensation. *J Vis Exp*. 2012;(66):e3869. Published 2012 Aug 21. doi:10.3791/3869

Villalpando-Reyna A, Cortés-Hernández D, Granjeiro J, Prado M, Gorokhovskiy A, Escobedo-Bocardo J, et al. Development of bioactive and biocompatible ceramic composites based on potassium polytitanate. *Proc Appl Ceramics*. 2019;13:149–56. doi:10.2298/pac1902149v.

Viana, FAB. Guia Terapêutico Veterinário. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks; 2014.

Villard N, Seneviratne C, Tsoi JK, Heinonen M, Matinlinna J. Candida albicans aspects of novel silane system-coated titanium and zirconia implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Mar;26(3):332-41. doi: 10.1111/clr.12338.

Vylkova S, Carman AJ, Danhof HA, Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. The fungal pathogen Candida albicans autoinduces hyphal morphogenesis by raising

extracellular pH. *mBio*. 2011;2(3):e00055-e11. Published 2011 May 17. doi:10.1128/mBio.00055-11

Wang J, Wang M, Chen F, Wei Y, Chen X, Zhou Y, et al. Nano-Hydroxyapatite Coating Promotes Porous Calcium Phosphate Ceramic-Induced Osteogenesis Via BMP/Smad Signaling Pathway. *Int J Nanomedicine*. 2019 Oct 3;14:7987-8000. doi: 10.2147/IJN.S216182.

Weichhold J, Gbureck U, Goetz-Neunhoeffler F, Hurle K. Setting Mechanism of a CDHA Forming α -TCP Cement Modified with Sodium Phytate for Improved Injectability. *Materials (Basel)*. 2019 Jun 29;12(13). pii: E2098. doi: 10.3390/ma12132098.

Willems HM, Kos K, Jabra-Rizk MA, Krom BP. *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. *Pathog Dis*. 2016 Jul;74(5). pii: ftw039. doi: 10.1093/femspd/ftw039.

Wu C, Chang J. A review of bioactive silicate ceramics. *Biomed Mater*. 2013 Jun;8(3):032001. doi: 10.1088/1748-6041/8/3/032001.

Wu C, Ramaswamy Y, Kwik D, Zreiqat H. The effect of strontium incorporation into CaSiO₃ ceramics on their physical and biological properties. *Biomaterials*. 2007;28(21): 3171–81. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.002

Wu YF, Wang YM, Jing YB, Zhuang JP, Yan JL, Shao ZK, et al. In vivo study of microarc oxidation coated biodegradable magnesium plate to heal bone fracture defect of 3 mm width. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2017;158:147–56. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.06.031.

Yahia IS, Shkir M, AlFaify S, Ganesh V, Zahran HY, Kilany M. Facile microwave-assisted synthesis of Te-doped hydroxyapatite nanorods and nanosheets and their characterizations for bone cement applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Mar 1;72:472-80. doi: 10.1016/j.msec.2016.11.074.

Yu X, Tang X, Gohil SV, Laurencin CT. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Adv Healthc Mater*. 2015 Jun 24;4(9):1268-85. doi: 10.1002/adhm.201400760.

Zhang F, Zhou M, Gu W, Shen Z, Ma X, Lu F, et al. Zinc-/copper-substituted dicalcium silicate cement: advanced biomaterials with enhanced osteogenesis and long-term antibacterial properties. *J Mater Chem B*. 2020 Jan 15. doi: 10.1039/c9tb02691f.