



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

KAÍKE LESSA CAMPORÊS

**AVALIAÇÃO DE BLENDA À BASE DE CIMENTO DE
ALUMINATO DE CÁLCIO COMO SUBSTITUTOS ÓSSEOS:
estudo *in vivo* e microbiológico**

2018

KAIÍKE LESSA CAMPORÊS

**AVALIAÇÃO DE BLENDA À BASE DE CIMENTO DE ALUMINATO DE CÁLCIO
COMO SUBSTITUTOS ÓSSEOS: estudo *in vivo* e microbiológico**

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: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientadora: Prof. Dra. Ivone Regina de Oliveira

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. 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).

Lessa Camporês, Kaíke

Avaliação de blendas à base de cimento de aluminato de cálcio como substitutos ósseos: estudo in vivo e microbiológico / Kaíke Lessa Camporês. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
46 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, 2018.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientadora: Ivone Regina de Oliveira

1. Biofilmes. 2. Cimentos para ossos. 3. Cimento de aluminato de cálcio. 4. Regeneração óssea. 5. Substitutos ósseos. I. Marotta Reis de Vasconcellos, Luana, orient. II. Regina de Oliveira, Ivone, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. 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. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Naira Correia Cusma Pelógia

Universidade de Taubaté (UNITAU)

São José dos Campos, 28 de setembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Alzira Maria Lessa e Joanito Camporês, que me guiaram e facilitaram meu caminho até aqui. Toda compreensão e esforço foram sentidos por mim. O amor é genuíno.

Não menos importante, à minha querida irmã, Gabriela Camporês, por todo o apoio e amor incondicional. Sempre estarei torcendo por você.

Aos meus amigos, parceiros de vida acadêmica desde os tempos de graduação e colegas Cirurgiões-dentistas, especialmente Stephanye Biss e Karoline Kiem. A amizade de longa data foi crucial para superar muitos pequenos momentos difíceis. Olho para trás com muito carinho. Vocês permanecem em meu coração.

Aos meus grandes amigos, Jocsã Freitas, Matheus Orechio e Ricardo Frizzera. Obrigado por serem suporte em muitos momentos, e principalmente pela compreensão da falta de tempo e dedicação aos amigos.

Às minhas amigas que conheci nessa jornada da Pós-graduação, colegas ingressantes no mesmo período, Damara Ávila e Aline Sampaio. Formamos um suporte mútuo em muitos momentos. Profunda torcida pelo sucesso e felicidade de vocês.

À minha amiga Vivian Narana, parceira, incrível e dedicada. Dividir moradia contigo foi especial. Você me inspira. Obrigado por todo o suporte, carinho e conhecimento compartilhado. Te desejo o que há de melhor nessa vida!

À minha orientadora durante as atividades de pesquisa na graduação em Odontologia, Profa. Dra. Gisele Maria Correr Nolasco, que facilitou minha inserção no mundo da pesquisa e docência. Profunda admiração por você e seu trabalho. Sua vida é uma inspiração no que concerne a equilíbrio.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, especialmente à coordenadora Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, principalmente aos que tiveram envolvimento direto durante minha jornada no Mestrado.

À Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, pela dedicação, compreensão, paciência e todo conhecimento compartilhamento.

À Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira, que esteve em parceria conosco nessa empreitada grandiosa dos nossos estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de 01/01/2017 a 01/05/2018.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio pesquisa, por meio do Processo nº 16/15032-3.

Ao Centro de Microscopia e Imagem da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/UNICAMP, principalmente nas pessoas do Adriano, técnico responsável, e ao Prof. Dr. Pedro Novaes.

Aos colegas e amigos que compartilharam seu conhecimento e tempo, principalmente agradecer à Damara, Daphne, Júlia e Vivian.

Aos funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, principalmente aos que contribuíram direta e indiretamente nessa jornada. Um agradecimento especial ao Walter Cruz. Sua dedicação e paciência é admirável.

*“A felicidade pode ser encontrada mesmo nos momentos mais escuros, só é preciso
lembrar-se de acender a luz”.*

J. K. Rowling

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4 RESULTADOS.....	27
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO.....	46

Camporê KL. Avaliação de blendas à base de cimento de aluminato de cálcio como substitutos ósseos: estudo *in vivo* e microbiológico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

O aluminato de cálcio (CAC) como biomaterial tem sido avaliado em relação as suas propriedades físicas, mecânicas e de biocompatibilidade, sendo que suas características únicas de endurecimento e microestrutura, o tornam um biomaterial de destaque. Estudos relataram aplicação destes cimentos na ortopedia visando neoformação óssea devido a sua composição e coeficiente de expansão térmica semelhante ao osso humano. O objetivo neste estudo foi avaliar composições de blendas à base de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CACH) como substitutos em defeitos ósseos. Cinco composições de blendas (alumina, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, quitosana, zircônia), além do cimento base CACH e de polimetilmetacrilato (PMMA), totalizando 07 grupos (n=5), foram avaliados quanto à neoformação óssea e formação de biofilme. Foi realizado um defeito ósseo monocortical de 3.0 mm nos fêmures direitos de 35 ratos *Wistar*, que foram preenchidos aleatoriamente com os materiais acima citados, sendo o grupo de PMMA utilizado como controle. Todos os animais foram eutanasiados após 30 dias a cirurgia. Posteriormente, foi realizada análise por microtomografia computadorizada para verificação da neoformação óssea na interface osso-biomaterial. Para avaliar a formação de biofilmes microbianos monotípicos, discos padronizados com 13,0 x 2,0 mm (n=6) dos 07 cimentos foram confeccionados. Cepas de referência de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa* foram cultivadas sobre as amostras e posteriormente o biofilme formado foi quantificado pelo método de MTT. O teste ANOVA foi utilizado para análise estatística e quando necessário foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$). Nos resultados da microtomografia observou-se que em todos os parâmetros as blendas exibiram melhores resultados que o grupo controle (PMMA) sendo observada diferença estatística ($p > 0,05$), blendas de hidroxiapatita e zircônia em geral se destacaram. Na formação de biofilmes foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre as blendas de quitosana e alumina e o grupo controle. Concluiu-se que as blendas à base de cimento de aluminato de cálcio com hidroxiapatita e zircônia são promissoras para utilização em preenchimentos de defeitos ósseos; uma vez que promovem maior neoformação óssea na interface e não alteram a formação de biofilmes microbianos monotípicos de *S. aureus*, *S. mutans* e *P. aeruginosa*, quando comparadas ao PMMA.

Palavras-chave: Biofilmes. Cimentos para ossos. Cimento de aluminato de cálcio. Regeneração óssea. Substitutos ósseos.

Camporês KL. Evaluation of cement-based calcium aluminate blends as a bones substitutes: in vivo and microbiological study [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Calcium aluminate as biomaterial has been evaluated for its physical, mechanical and biocompatibility properties. Calcium aluminate based materials exhibit, due to their unique hardening and microstructure characteristics, a great potential as a biomaterial. Studies have reported the application of these cements in orthopedics aimed at bone neoformation due to its composition and coefficient of thermal expansion similar to human bone. Thus, the aim of this study is to evaluate compositions of calcium aluminate cement based blends as substitutes for bone defects. Five compositions of blends (alumina, tricalcium phosphate, hydroxyapatite, chitosan, zirconia), in addition to the base cement consisting of homogeneous calcium aluminate (CACH) and polymethylmethacrylate (PMMA) cement are being evaluated for bone repair and biofilm formation. A monocortical bone defect of 3.0 mm was performed in the right femurs of 35 Wistar rats, these were randomly filled with the already mentioned materials, and the PMMA group was used as control, totaling 07 study groups (n=5). All animals were euthanized within four weeks. Subsequently, a computerized microtomography analysis was performed to verify bone repair. To evaluate the formation of monotypic microbial biofilms, standardized discs with 13.0 x 2.0 mm (n=6) of the seven types of cements evaluated were prepared. Reference strains of Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans and Pseudomonas aeruginosa were cultured on the samples and subsequently the biofilm formed was quantified by the MTT method. The ANOVA test was used for statistical analysis and when necessary the Tukey multiple comparison test ($p < 0.05$) was applied. In the results of the microtomography, it was observed that in all parameters the blends exhibited better results than the control group (PMMA), with statistically significant differences ($p > 0.05$), hydroxyapatite blends and zirconia in general. In the biofilm formation, a statistical difference ($p > 0.05$) was observed between the chitosan and alumina blends and the control group. It was concluded that calcium aluminate cement-based blends with hydroxyapatite and zirconia are promising for use in bone defect fills; since they promote greater bone neoformation at the interface and do not alter the formation of monotypic microbial biofilms of S. aureus, S. mutans and P. aeruginosa when compared to PMMA.

Keywords: Biofilms. Bone cements. Bone regeneration. Bone substitutes. Calcium aluminate Cement.

1 INTRODUÇÃO

A regeneração óssea tem sido uma abordagem desafiadora, promovendo e instigando estudos promissores na área biomédica (Tabata, 2009). Procedimentos cirúrgicos para regeneração e reparo de defeitos em tecidos orais e craniofaciais, decorrentes de traumas, tumores, infecções, desenvolvimento anormal do esqueleto ou doença progressiva degenerativa, apresentam um enorme desafio e a recuperação desses tecidos é um assunto que envolve a clínica, a ciência básica e a bioengenharia. Além disso, normalmente envolvem a utilização de biomateriais, como enxertos, de diferentes origens (Tabata, 2009; Corbi et al., 2012; Prakasam et al., 2015). A utilização de biomateriais como substitutos ósseos tem proporcionado novos paradigmas e alternativas à odontologia e à ortopedia (Corbi et al., 2012).

A engenharia tecidual tem sido desenvolvida e revolucionado a área de regeneração e reparo tecidual. Esse processo é relativamente complexo, e por conta disso, a engenharia tecidual é um campo multidisciplinar que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados, por meio de melhorias nas terapias já existentes. Deste modo, essa ciência visa criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida, o que resulta em redução significativa de custos (Soares, 2010).

O biomaterial de maior destaque na fixação de próteses, consolidação de fraturas ou reconstrução de defeitos ósseos é o cimento ósseo, também conhecido como cimento ortopédico ou acrílico (Engqvist et al., 2008). O cimento ósseo é um material composto pela mistura de um polímero (pó) e um monômero (líquido), conhecido como polimetilmetacrilato (PMMA), os quais são unidos pelo processo de polimerização. Atualmente, todos os cimentos ósseos no mercado são baseados quimicamente na mesma substância, o metilmetacrilato (MMA), um éster do ácido metacrílico. O PMMA apresenta excelentes propriedades mecânicas, entretanto, apresenta algumas deficiências com relação a propriedades de manuseio e biocompatibilidade (Alves et al., 2006; Engqvist et al., 2008). Adicionalmente exibe reações exotérmicas, que geram excesso de calor no tecido circundante podendo

causar danos ao mesmo, se não observados todos os cuidados para o seu uso. Outra desvantagem é que este cimento não pode ser injetado imediatamente após a sua mistura devido a consistência muito líquida, além de apresentar um forte odor quando manipulado. Além disso, depois de implantado, pode promover necrose química atribuída à liberação de monômero não-reagido durante a sua manipulação. Ressalta-se também que o PMMA não auxilia na remodelação óssea, pois não é um material bioativo (Alves et al., 2006). A alta velocidade de reação do polímero também pode ocasionar queda da resistência mecânica do material, devido à má homogeneização durante o preparo, bem como a incorporação de ar. Assim, os inconvenientes com o atual tratamento padrão são principalmente durante o manuseio e endurecimento do PMMA, sendo necessário o desenvolvimento de novos produtos visando superar essas deficiências bem como melhorar as reações biológicas do mesmo (Engqvist et al., 2008).

O aluminato de cálcio como biomaterial tem sido estudado desde o início da década de 1990 em relação às suas propriedades físicas e mecânicas, e também sobre sua biocompatibilidade (Kimura et al., 1991; Hermansson, 2011). O uso de cimento de aluminato de cálcio (CAC) como biomaterial tem sido motivado na ortopedia devido a suas características como alta viscosidade, permitindo injeção direta no local requerido logo após a mistura, biocompatibilidade e baixa reação exotérmica (Engqvist et al., 2008; Burger, 2010). Os materiais à base de aluminato de cálcio exibem, devido suas características únicas de presa/endurecimento e microestrutura, um grande potencial como substituto ósseo (Hermansson, 2011). Estudos relataram a aplicação dos cimentos de aluminato na ortopedia para reparo de defeitos ósseos devido a sua composição e coeficiente de expansão térmica bastante semelhante ao do osso humano (Kraft, 2002; Kopanda, MacZura, 1990).

Garcia et al. (2015) avaliaram e compararam o reparo de defeitos ósseos preenchidos com cimento de aluminato de cálcio, agregado trióxido mineral (MTA) ou hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que a composição de cimento de aluminato de cálcio e MTA permitiram o reparo completo de defeitos ósseos confeccionados em tíbias de rato. Castro-Raucci et al. (2017) analisaram uma composição à base de CAC contendo 10% de peso de CaCl_2 (CAC+) que promoveram a aquisição do fenótipo de células osteogênicas *in vitro*, tornando este

novo material uma alternativa potencial em procedimentos endodônticos visando um aumento ou aceleração do reparo ósseo periapical.

Blendas à base de cimento de aluminato de cálcio representam uma nova alternativa de biomateriais para o reparo e regeneração óssea, visando uma agregação de melhores propriedades biológicas e biomecânicas (Hermansson, 2011).

Composição de CAC com zircônia como aditivo foi aplicada em estabilização de fraturas de compressão vertebral, apresentando valores de resistência à compressão similar ao PMMA, estabilidade após seis meses em solução tampão fosfato e porosidade de 10-15% (Engqvist et al., 2008). Um estudo *in vivo* realizado em vértebras de ovelhas indicou menor inflamação e melhor adaptação do osso em materiais à base de CAC quando comparados com o PMMA (Hermansson et al., 2008). A zircônia (ZrO_2) é um dióxido policristalino cerâmico do metal de transição zircônio (Zr). Possui excelentes propriedades mecânicas e biológicas, como baixa corrosão, toxicidade e aderência bacteriana, por isso vêm sendo incorporada em biomateriais (Dion, 1997; Denry, 2008).

Semelhantemente à zircônia, em questão de aplicabilidade em biomateriais, é a hidroxiapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$], que em sua forma natural, constitui a parte inorgânica e mineral de estruturas corpóreas. É o principal componente mineral dos ossos e dentes, promovendo a dureza característica dessas estruturas. É formada por fosfato de cálcio cristalino, sendo que cálcio e fosfato são os seus constituintes químicos básicos. A hidroxiapatita (HA), produzida artificialmente em laboratório a partir do fosfato de cálcio, é uma substância biocompatível, bioativa e com propriedades osteocondutoras, conferindo ampla aplicação e interesse de muitos estudos na área biomédica (Jarcho, 1992; García-Garduño et al., 2006; Venkatesan et al., 2014; Prakasam et al., 2015). A hidroxiapatita em sua forma nanoestruturada e quimicamente sintetizada tem sido utilizada em tratamentos no tecido ósseo (Venkatesan et al., 2014).

O fosfato tricálcico também é uma das formas do fosfato de cálcio, estando disponível na forma porosa ou sólida. Sua estrutura na forma porosa apresenta semelhanças com o osso esponjoso, principalmente em comparação com valores de resistência à compressão e à tração (Jarcho, 1981; Moore et al., 2001). Além disso, assim como outros derivados do fosfato de cálcio, apresenta propriedades

osteocondutoras e biocompatibilidade (Hollinger, Battistone, 1986, Moore et al., 2001).

O potencial do fosfato tricálcico em composições para uso como substituto ósseo é relatado na literatura, como no estudo de Sawada et al. (2018), que avaliou *in vivo* três tipos de biomateriais (mineral ósseo bovino desproteínizado, β -fosfato tricálcico e uma mistura de α -fosfato tricálcico com hidroxiapatita) como substitutos ósseos em blocos na neoformação óssea e na reabsorção do enxerto. Os resultados mostraram adequada incorporação junto ao defeito ósseo em todos os materiais, sendo que β -fosfato tricálcico apresentou um volume relativamente maior de neoformação óssea.

Outro interessante aditivo é a quitosana, um polímero catiônico pseudo-natural, biocompatível, que possui propriedades antifúngicas e bactericidas, além de uma adequada permeabilidade ao oxigênio (Bano et al., 2017; Verlee et al., 2017). Alguns estudos têm relatado suas excelentes propriedades biológicas e aplicabilidade no reparo e na regeneração de feridas, além de atuar como agentes antimicrobianos (Arancibia et al., 2014; Mostafa, Darwish, 2014; Vasile et al., 2014; Bano et al., 2017).

Elkholy et al. (2018) avaliaram um compósito de β -quitosana acrescido de nano-hidroxiapatita com diferentes porcentagens com relação as suas propriedades físicas e mecânicas e aplicabilidade desse composto como material de enxerto ósseo. Os resultados indicaram que o compósito na proporção 30/70 entre β -quitosana e hidroxiapatita como substituto ósseo biodegradável apresentou uma adequada neoformação óssea e acelerada formação dos canais de Havers, além de demonstrar resistência mecânica satisfatória para ser empregado como biomaterial implantado em forma sólida.

A alumina também é um material biocompatível potencial, com adequada resistência à flexão, à compressão e à fadiga dinâmica (Mobasherpour et al., 2009, Askari et al., 2012). É reportado sua utilização como reforço em biomateriais como substitutos ósseos para promover melhor dureza e resistência dos mesmos (Huang, Nicholson, 1993; Shirazi et al., 2014).

Parreira et al. (2016) pesquisaram *in vitro* o desenvolvimento de blendas à base de CAC contendo diferentes teores de alumina, zircônia, óxido de zinco, hidroxiapatita, fosfato tricálcico, quitosana e colágeno, além de combinações com

aditivos radiopacos como prata e óxido de bismuto. Os resultados obtidos mostraram que blendas de CAC contendo 4% de peso dos diferentes compostos, com exceção de colágeno, resultaram em amostras com alta resistência mecânica à compressão (similar ao PMMA). Além disso, essas mesmas composições, no estudo de Oliveira et al. (2017) se mostraram bioativas quando em contato com fluido corporal simulado, além de apresentarem baixos níveis de porosidade e baixos valores de espessura dos mesmos, sendo associado à precipitação de uma fase de apatita sobre a superfície das diferentes composições.

Os produtos à base de CAC são provenientes de uma nova geração de biomateriais, que vem sendo desenvolvidos a fim de desempenhar suas funções em longo prazo acompanhando o aumento da expectativa de vida da população. Em se tratando de saúde, o cimento de aluminato de cálcio é um biomaterial versátil que também apresenta como vantagem a redução do preço de produtos assim derivados e, diminui a dependência de produtos importados (Parreira et al., 2016; Oliveira et al., 2017).

A utilização de um cimento injetável, tal como o CAC, traz como vantagens a preparação *in-situ* do material, redução do tempo de cirurgia, mínima cavidade para a implantação e perfeito ajuste à geometria óssea do defeito, tendo como resultado menores traumas e melhoria da qualidade de vida do paciente (Alves et al., 2006).

Ensaio realizados *in vivo* permitem a avaliação do comportamento do biomaterial em meio biológico vivo, fornecendo informações úteis sobre a reação orgânica induzida pelo biomaterial na área da interface biomaterial-tecido ósseo, visualizando e quantificando a possível neoformação óssea (Spicer et al., 2012).

A análise de formação de biofilmes sobre os diferentes cimentos deste estudo faz-se relevante frente à necessidade de um biomaterial, preferencialmente, ser inerte à aderência microbiana. Desde 1970 tem se preocupado em estudar medidas profiláticas agregadas a biomateriais e, além disso, em desenvolvê-los com menor capacidade de aderência microbiana, sendo necessárias pesquisas que englobem tais aspectos (Buchholz, Engelbrecht, 1970; Minelli et al., 2011; Koseki et al., 2014; Butini et al., 2018; Stravinskas et al., 2018; Yang et al., 2018).

Staphylococcus aureus, *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa* são micro-organismos patogênicos comuns em infecções ósseas, inclusive em pós-cirúrgicos com uso de biomateriais, apresentando potencial de destruição óssea em

contato direto por aderência de biofilme, principalmente em casos de falhas na defesa do sistema imune do hospedeiro (Hsu et al., 2017; Junka et al., 2017; Balsa et al., 2018; Seyedmajidi et al., 2018; Smith et al., 2018; Tuon et al., 2018).

Diversos cimentos são comumente usados em cirurgias de preenchimento ósseo tanto na odontologia quanto na ortopedia, e em geral, em procedimentos invasivos (Alves et al., 2006; Engqvist et al., 2008). Nesse contexto, as melhorias impostas às propriedades dos materiais percorrem a necessidade de estudos que pesquisem composições que funcionem com excelência na função de substituir o tecido ósseo, desejando-se encontrar as que apresentem adequadas propriedades biológicas e biomecânicas para o reparo do tecido ósseo, além de que facilite seu uso e possibilite técnicas cirúrgicas minimamente invasivas.

A avaliação de novas blendas à base de CAC, que são inéditas para o estudo *in vivo*, é o ponto diferencial deste estudo. O resultado esperado é que estes aditivos tornem o CAC mais atrativo para a proliferação e diferenciação celular, culminando em maior neoformação óssea ao redor da área preenchida com as blendas à base de CAC. Além disso, estes não devem promover formação de biofilmes.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar blendas à base de cimento de aluminato de cálcio (alumina, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, quitosana, zircônia) quanto à neoformação óssea na interface osso-biomaterial, além de formação de biofilmes monotípicos de *S. aureus*, *S. mutans* e *P. aeruginosa*.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos serão avaliar:

- a) a neoformação na interface do tecido ósseo com os diferentes cimentos;
- b) a formação de biofilmes monotípicos de *S. aureus*, *S. mutans* e *P. aeruginosa* sobre as amostras dos cimentos estudados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Confeção das blendas

Foram pesquisadas cinco novas composições de blendas à base de cimento de aluminato de cálcio (alumina, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, quitosana, zircônia), além do cimento base constituído de aluminato de cálcio homogêneo (CACH). O cimento de polimetilmetacrilato – PMMA foi utilizado como controle, totalizando 7 grupos de estudo (Quadro 1).

O cimento de PMMA (Biomecanica, Jaú, Brasil) foi preparado e utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Os cimentos à base de cimento de aluminato de cálcio (blendas) foram espatulados e preparados para injetabilidade na proporção de 76% parte sólida, sendo 4% de peso de alumina, fosfato tricálcico, hidroxiapatita e zircônia, e de 1% de peso de quitosana, além do CAC homogêneo, acrescidos de água destilada. A injetabilidade dos cimentos é obtida para utilização com seringas hipodérmicas.

Quadro 1 – Divisão dos grupos para avaliação da neoformação óssea e formação de biofilmes microbianos

GRUPOS	
Cimento de polimetilmetacrilato - PMMA	PMMA
Cimento de aluminato de cálcio homogêneo	CACH
Blenda de CAC com quitosana	QTS
Blenda de CAC com hidroxiapatita	HA
Blenda de CAC com zircônia	ZRC
Blenda de CAC com alumina	ALM
Blenda de CAC com fosfato tricálcico	FTC

Fonte: elaborado pelo autor.

3.2 Ensaios *in vivo*

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciência e Tecnologia da Unesp - Campus de São José dos Campos (CEUA / Unesp – CSJC – ICT) sob o número 07/2017 e os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Para os ensaios *in vivo*, 35 ratos adultos (*Rattus norvegicus*, variação albinus, *Wistar*), pesando cerca de 300 g, foram utilizados para avaliação da neoformação óssea na interface osso-biomaterial. Aos 90 dias de idade foi realizado um defeito ósseo monocortical de 3,0 mm de diâmetro em cada fêmur direito, de todos os animais, que foram aleatoriamente divididos nos 07 grupos (n=5).

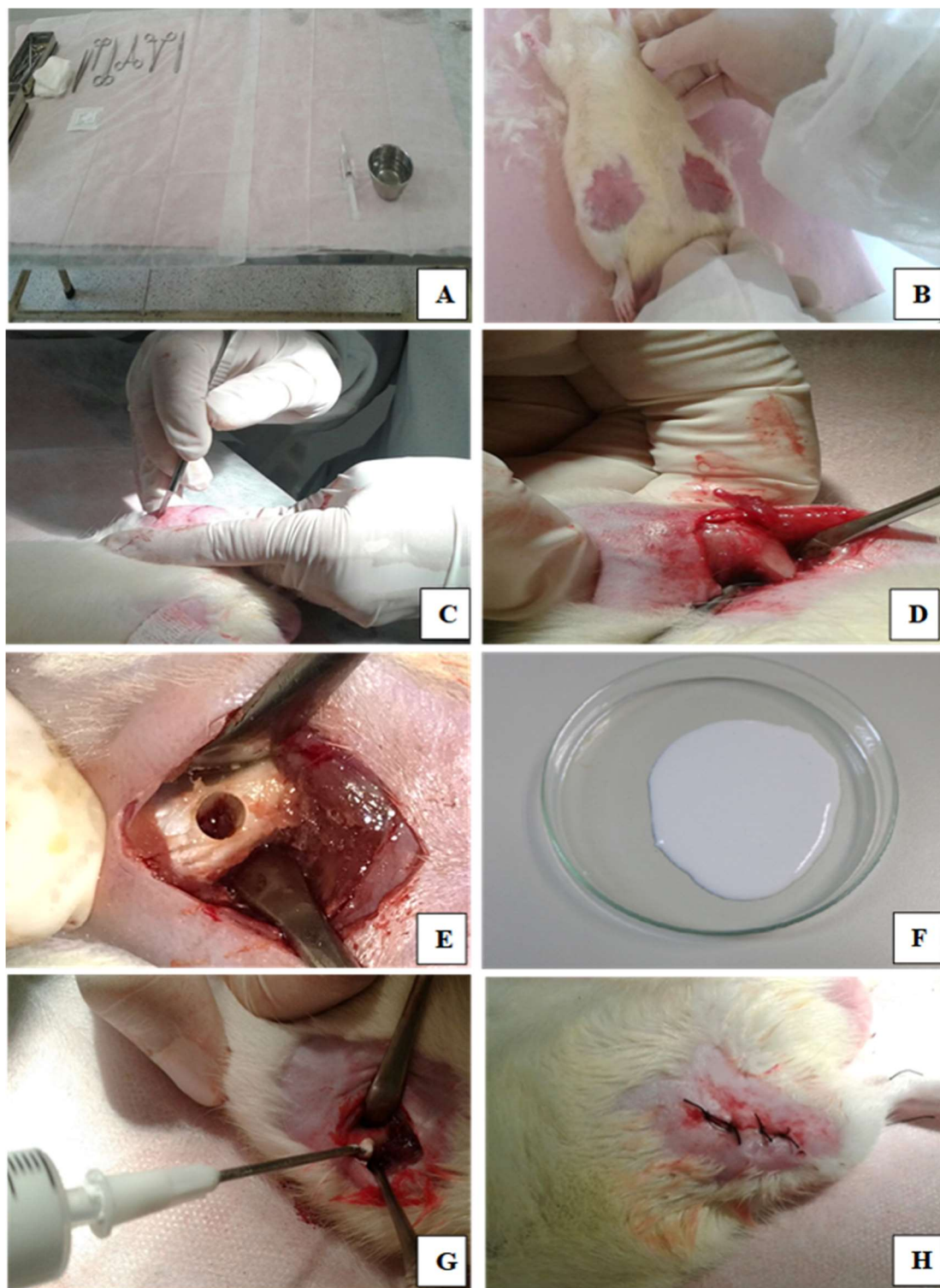
Previamente à cirurgia, os animais foram pesados e anestesiados, e a mesa cirúrgica foi preparada (Figura 1 – A). Os fármacos utilizados nos procedimentos anestésicos e suas respectivas concentrações foram: cloridrato de xilazina 2,3 g/100 mL (Anasedan® - Vetbrands, Jacaré - Brasil), substância sedativa e relaxante muscular; e Cloridrato de Ketamina 1,16 g/10 mL (Dopalen® – Vetbrands, Jacaré - Brasil), anestésico geral. Inicialmente, foi preparada uma solução contendo a mistura de 0,8 mL de cloridrato de xilazina e 0,5 mL de cloridrato de Ketamina. Em seguida, para promover uma anestesia geral, cada animal recebeu, por via intramuscular, 0,1 mL/100 g de peso da solução previamente preparada, de forma que um animal pesando 300 g recebeu 0,3 mL da solução. Após a anestesia dos animais, os locais cirúrgicos dos fêmures direito foram submetidos à tricotomia e à antissepsia com solução de álcool iodado (Figura 1 - B). A incisão foi realizada com lâmina de bisturi número 15 na região correspondente a face medial dos fêmures (Figura 1 – C). Os músculos foram divulsionados para expor a cortical óssea (Figura 1 – D) onde foi confeccionado um defeito com diâmetro final de 3,0 mm utilizando brocas de diâmetros progressivos (Figura 1 – E), sob irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, visando evitar o aquecimento decorrente do atrito das brocas com o osso. Enquanto os defeitos ósseos eram confeccionados, os cimentos foram preparados (Figura 1 – F). Após o preparo, os cimentos foram injetados, utilizando-se seringas hipodérmicas, nos defeitos ósseos confeccionados (Figura 1 – G).

Após o preenchimento dos defeitos com os materiais injetáveis, os tecidos foram reposicionados e a camada muscular e a pele foram suturadas com fio de seda nº 4 (Ethicon/Johnson & Johnson) (Figura 1 – H). Novamente foi realizada antissepsia com álcool iodado. Ao término da cirurgia, foi administrado um fármaco analgésico (dipirona sódica monohidratada 150 mg/kg), por via subcutânea, a cada 8 h, até 48 h após a cirurgia.

Após a cirurgia, os ratos foram colocados em gaiolas contendo 5 animais, com ração e água *ad libitum*, em ambiente com exaustão do ar. Durante este período pós-cirúrgico, foram monitorados, inicialmente, 2 h após, período de recuperação anestésica, e a cada 24 h até o prazo da eutanásia de 30 dias.

Para a eutanásia, os animais foram submetidos à anestesia geral profunda e posterior decapitação. A substância injetada intramuscularmente foi uma mistura de 33 mg/Kg de quetamina (Dopalen - Agibrands do Brasil Ltda.) com cloridrato de xilazina 2,3g/100ml (Anasedan® - Vetbrands, Jacareí - Brasil) na dose três vezes maior do que a sedativa. As peças, após a eutanásia, foram mantidas em formol tamponado a 10% até o momento da análise por microtomografia.

Figura 1 – Procedimento cirúrgico: A) mesa cirúrgica; B) tricotomia da região; C) incisão; D) fêmur direito exposto com os tecidos divulsionados; E) defeito ósseo confeccionado; F) cimento preparado; G) injetabilidade do cimento no defeito ósseo; H) Tecidos reposicionados e suturados



Fonte: elaborada pelo autor.

3.2.1 Análise por microtomografia computadorizada (μ CT)

Para a realização da análise não-destrutiva do osso neoformado na interface osso/biomaterial, as peças experimentais de tecido ósseo foram retiradas do formol e colocadas em álcool 70°. Posteriormente foram submetidas ao microtomógrafo de raios-X SkyScan 1174 Bruker MicroCT (Kontich, Bélgica), localizado no Centro de Microscopia e Imagem da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/UNICAMP (Figura 2).

Após a aquisição das imagens, foram realizadas análises por imagens em 3D, onde os parâmetros avaliados foram volume ósseo (BV), proporção entre volume ósseo e volume total (BV/TV), números de trabéculas (Tb.N), espessura trabecular (Tb.Th) e espaçamento trabecular (Tb.Sp).

Figura 2 - Microtomógrafo de raios-X SkyScan 1174 Bruker MicroCT.



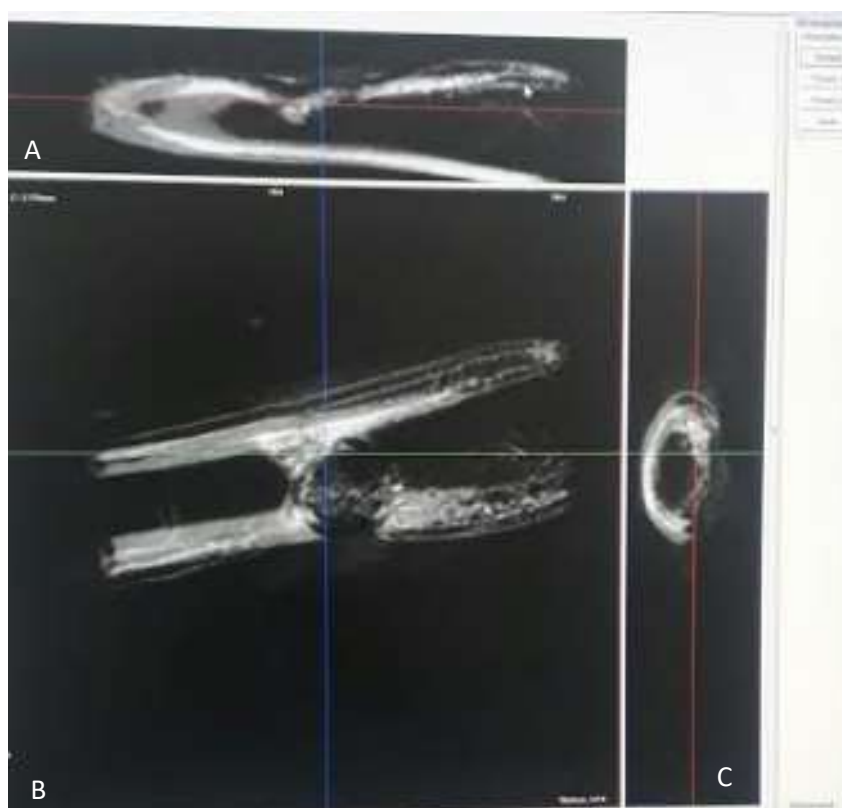
Fonte: elaborada pelo autor.

Previamente a aquisição, as peças foram posicionadas e fixadas no porta-amostra apropriado para o equipamento, presas no tubo cilíndrico apropriado para o tamanho da amostra e envolta por papel úmido, assim estabilizando a amostra, a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento e evitando o ressecamento da peça.

O parâmetro para reconstrução da imagem em μCT foi o escaneamento com rotação das peças em 360° , utilizando cortes de $12\ \mu m$ de espessura (50 kV e 800 μA), com filtro de alumínio de 0.5 mm de espessura e passo de rotação de 0.5° . Os *softwares* NRecon[®] e Dataviewer[®] foram utilizados para a reconstrução das imagens e os *softwares* CT-Analyzer[®], CT-Vol[®] para a quantificação da formação óssea. As projeções tomográficas foram construídas a partir do programa NRecon[®], que gerou imagens em 3D. Em seguida, foi utilizado o programa Dataviewer[®] para visualização e avaliação em 2D, sendo que neste momento foi realizada a escolha do eixo a ser avaliado, eixos coronal, transaxial e sagital.

O eixo sagital (B) foi escolhido para se realizar a medição volumétrica (Figura 3).

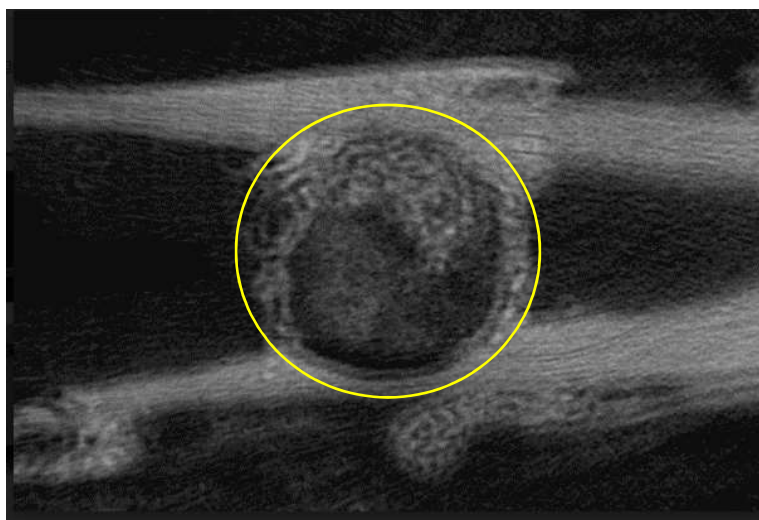
Figura 3 – Escolha do eixo sagital no DataViewer[®].



Fonte: elaborada pelo autor.

As análises volumétricas (3D) tiveram por objetivo quantificar o volume ósseo, referente a neoformação óssea, nos diferentes grupos, sendo que a área determinada para mensuração compreendeu a área da interface entre o material e o osso, medindo, portanto, 3,5 mm que era maior do que o diâmetro do defeito. A “região de interesse” ou ROI (Figura 4) foi selecionada utilizando uma figura geométrica circular, que se adequa por interpolação à área a ser medida e obtivemos o volume de interesse (VOI). Cada imagem obtida no momento do processamento pelo microtomógrafo foi considerada como representativa de uma porção volumétrica da amostra. As imagens sobrepostas formam um sólido tridimensional representativo da amostra de osso. O ROI se refere a uma região selecionada de uma única imagem de seção transversal, já o “volume de interesse” refere-se a soma de todos os ROIs presentes nos cortes selecionados, representando o volume 3D requerido para análise.

Figura 4 – Delimitação do ROI.



Fonte: elaborada pelo autor.

Logo após a delimitação do ROI, a binarização (que é a formação de uma imagem utilizando somente as cores preto e branco), foi utilizada como uma ferramenta para diferenciar o osso do restante do tecido. Inicialmente foi necessário um ajuste e posteriormente a padronização deste valor limiar para os pixels

("threshold"), que foi aplicado a todas as imagens avaliadas. O limite inferior determinado correspondeu ao valor de 65 e o limite superior foi o valor de 25, a mesma binarização foi usada para todas as amostras.

No *software* CTAnalyser® foi realizada a construção dos parâmetros morfométricos do volume ósseo. Inicialmente foram selecionadas as 100 fatias (*slices*) utilizadas para a região de interesse (ROI), nas quais era possível enxergar o diâmetro completo do defeito até que ele desaparecesse. Na seleção das imagens utilizou-se a ferramenta "top" e "bottom".

Após esta seleção, foi realizada a interpolação do ROI sobre as 100 imagens escolhidas, para permitir o cálculo em 3D dos índices de volume volume ósseo (BV), proporção entre volume ósseo e volume total (BV/TV), números de trabéculas (Tb.N), espessura trabecular (Tb.Th) e espaçamento trabecular (Tb.Sp).

3.3 Avaliação da formação de biofilmes microbianos

Discos padronizados com 13,00 mm de diâmetro x 2,00 mm de altura (n=6) (Figura 5) dos 7 tipos de cimentos avaliados (Quadro 1) deste estudo foram submetidos à avaliação da formação de biofilmes microbianos monotípicos. Esses discos foram confeccionados em padronização e submetidos à esterilização prévia aos testes de biofilmes. A esterilização das amostras foi realizada em estufa a 110 °C por 2 horas. Foram utilizadas cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus mutans* (ATCC 35688) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do ICT – Unesp, Campus de São José dos Campos.

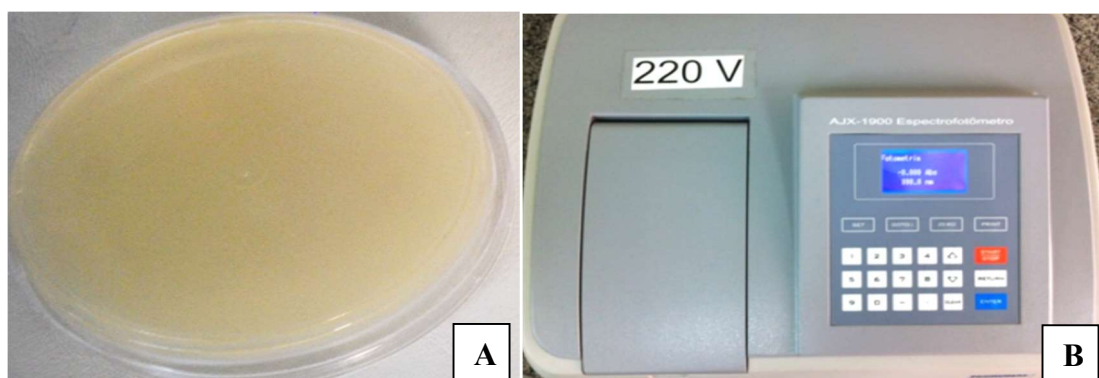
Figura 5 – Representação dos discos padronizados dos cimentos avaliados.



Fonte: elaborada pelo autor.

As cepas foram cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* – BHI (Figura 6 - A) por 24 h cada a 37°C. No caso de *S. mutans*, foi utilizado a estufa de CO₂ a 5%. Em seguida, cada caldo foi centrifugado (2000 rpm/10 min), o sobrenadante descartado e o *pellet* suspenso em solução fisiológica (NaCl 0,9%), padronizadas a 10⁶ céls/mL em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil) (Figura 6 – B), de acordo com o comprimento de onda e densidade óptica (DO) de cada micro-organismo (DO de *S. aureus* – 0,374; *S. mutans* – 0,620; *P. aeruginosa* – 0,08).

Figura 6 – A) Meio sólido para cultivo das cepas; B) Espectrofotômetro utilizado na padronização dos micro-organismos.

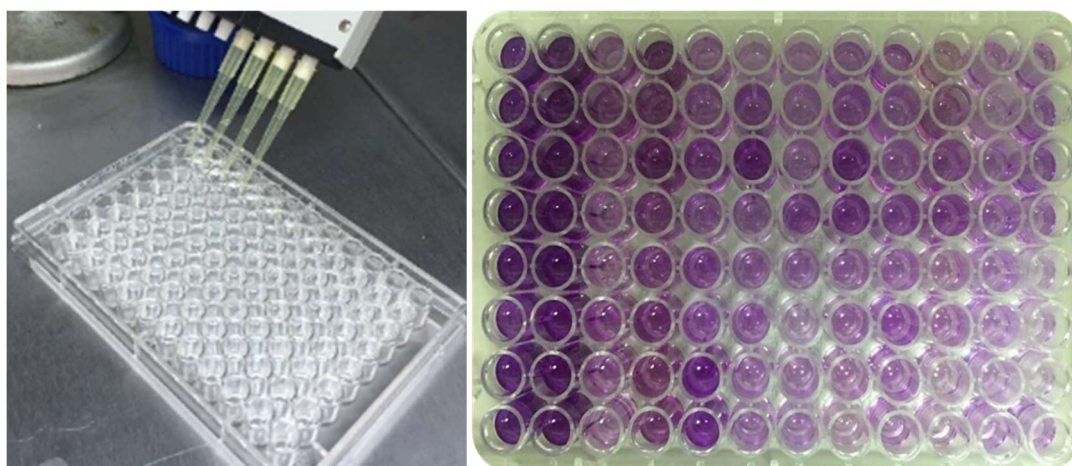


Fonte: elaborada pelo autor.

Para a formação dos biofilmes monotípicos de *S. aureus*, *S. mutans* e *P. aeruginosa*, as amostras de todos os grupos foram distribuídas nos poços das microplacas (24 poços). Em seguida, foi adicionado 100 µL/poço de cada suspensão microbiana padronizada (10^6 céls/mL) e realizada incubação com agitação frequente a 37°C por 24 h para formação de biofilme inicial. Posteriormente ao período de formação de cada biofilme, as amostras foram transferidas para outra microplaca de 24 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça) e lavados com solução fisiológica estéril por três vezes.

Posteriormente a solução fisiológica estéril foi removida, e foi adicionado 500 µL do corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenilcarboxil] (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Alíquotas de MTT a 0,5 mg/mL em água destilada foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação do biofilme com esta solução por 1 h a 37°C, em estufa. Para *S. mutans*, a incubação foi realizada na estufa de CO₂ a 5%. Após esse período, a solução de MTT foi removida e foi adicionado 500 µL da solução de DMSO (Dimethyl Sulfoxide) que permaneceu nos poços por 10 min em estufa a 37°C. A seguir, a placa foi colocada sob agitação por dez minutos para solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 100 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) (Figura 7) para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU). Os dados foram aferidos como absorbância.

Figura 7 – Transferência para placa de 96 poços para medida colorimétrica.



Fonte: elaborada pelo autor.

3.4 Análise dos resultados

Inicialmente, os dados obtidos na microtomografia computadorizada e na formação de biofilmes monotípicos foram submetidos à análise de variância ANOVA um critério, prosseguindo com o teste de comparação múltipla de Tukey, utilizando o *software* GraphPad Prism versão 7.04. O nível de significância adotado foi o valor convencional de 5%.

4 RESULTADOS

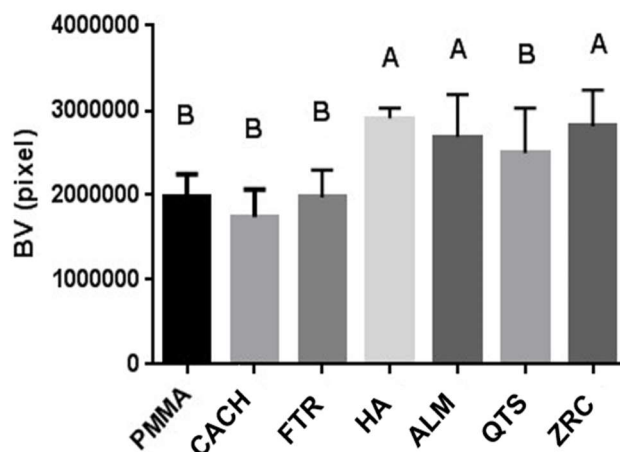
4.1 Análise por microtomografia computadorizada

As peças foram submetidas à análise por imagem em 3D, utilizando o método da microtomografia computadorizada (μ CT) para quantificar a proliferação de tecido ósseo na interface com o material. Em seguida, foram avaliados os parâmetros de volume ósseo (BV), proporção entre volume ósseo e volume total (BV/TV), números de trabéculas (Tb.N), análise de espessura de trabéculas (Tb.Th) e da separação das trabéculas (Tb.Sp).

Os resultados estatísticos descritivos e inferenciais estão apresentados abaixo.

Os dados da estatística descritiva relativa ao volume ósseo (BV) obtido por meio da μ TC estão representados na figura 8.

Figura 8 – Gráfico dos valores médios (pixels) e desvio padrão ($\pm$) de volume ósseo (BV) para os diferentes grupos.



Legenda: PMMA=cimento de polimetilmetacrilato; CACH=cimento de aluminato de cálcio homogêneo; FTR=blenda com fosfato tricálcico; HA=blenda com hidroxiapatita; ALM=blenda com alumina; QTS=quitosana; ZRC=blenda com zircônia.

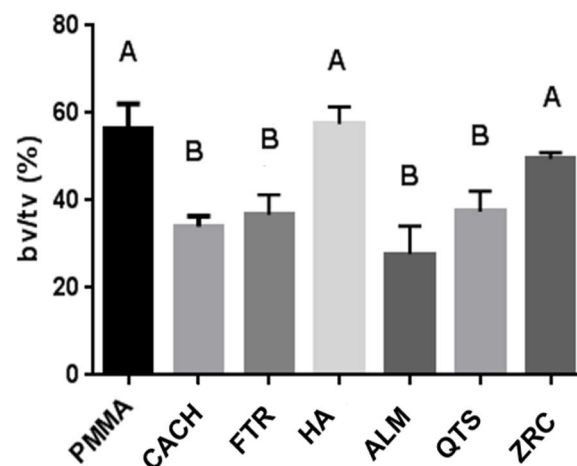
*Letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados obtidos quanto ao volume ósseo foram submetidos ao teste ANOVA um fator e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o cimento CACH e as blendas de fosfato tricálcico e quitosana em relação ao PMMA ($p>0,05$). Entretanto, foi observada diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos PMMA e hidroxiapatita, alumina e zircônia, sendo que o maior valor médio de volume ósseo foi verificado nos grupos destas blendas.

Os dados da estatística descritiva relativa a proporção entre volume ósseo e volume total (BV/TV) obtido por meio da μ TC estão representados na figura 9.

Figura 9 – Gráfico dos valores médios (% pixels) e desvio padrão ($\pm$) da proporção entre volume ósseo e volume total (BV/TV) para os diferentes grupos.



Legenda: PMMA=cimento de polimetilmetacrilato; CACH=cimento de aluminato de cálcio homogêneo; FTR=blenda com fosfato tricálcico; HA=blenda com hidroxiapatita; ALM=blenda com alumina; QTS=quitosana; ZRC=blenda com zircônia.

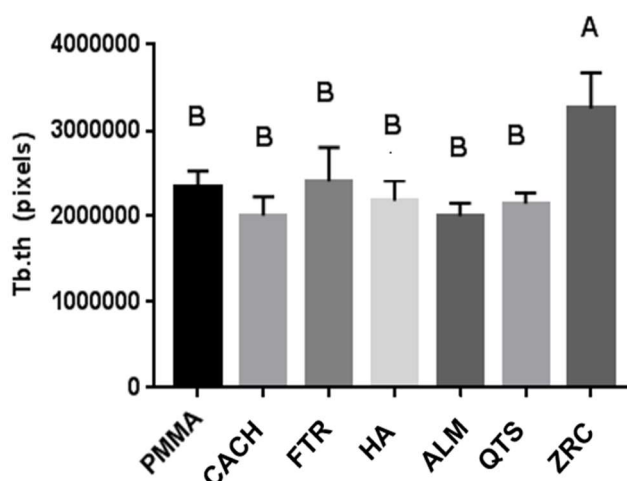
*Letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados obtidos quanto proporção entre volume ósseo e volume total (BV/TV) foram submetidos ao teste ANOVA um fator e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as blendas de hidroxiapatita (HA) e zircônia em relação ao PMMA ($p>0,05$), sendo que os maiores valores médios de BV/TV estão nesses grupos. Entretanto, foi observada diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos PMMA, CACH, fosfato tricálcico, alumina e quitosana.

Os dados da estatística descritiva relativa à espessura trabecular (Tb.Th) obtido por meio da μ TC estão representados na figura 10.

Figura 10 – Gráfico dos valores médios (pixels) e desvio padrão ($\pm$) da espessura trabecular (Tb.Th) para os diferentes grupos.



Legenda: PMMA=cimento de polimetilmetacrilato; CACH=cimento de aluminato de cálcio homogêneo; FTR=blenda com fosfato tricálcico; HA=blenda com hidroxiapatita; ALM=blenda com alumina; QTS=quitosana; ZRC=blenda com zircônia.

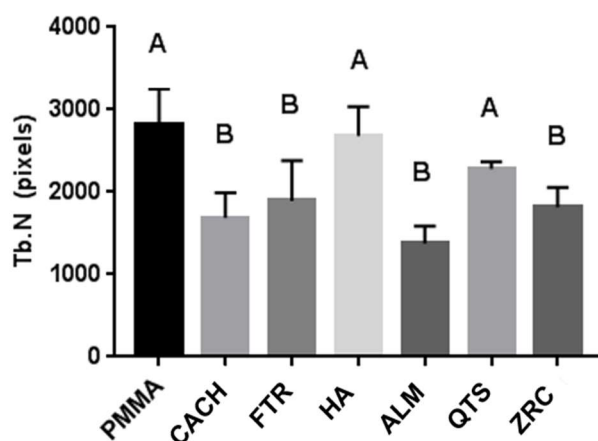
*Letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados obtidos quanto à espessura trabecular (Tb.Th) foram submetidos ao teste ANOVA um fator e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o cimento CACH e os grupos das blendas de fosfato tricálcico, hidroxiapatita (HA), alumina e quitosana em relação ao PMMA ($p > 0,05$). Entretanto, foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo zircônia, que diferiu de todos os demais grupos, apresentando o maior valor médio de espessura trabecular.

Os dados da estatística descritiva relativa ao número de trabéculas por unidade de comprimento (Tb.N) obtido por meio da μ TC estão representados na figura 11.

Figura 11 – Gráfico dos valores médios (pixels) e desvio padrão ($\pm$) do número de trabéculas por unidade de comprimento (Tb.N) para os diferentes grupos.



Legenda: PMMA=cimento de polimetilmetacrilato; CACH=cimento de aluminato de cálcio homogêneo; FTR=blenda com fosfato tricálcico; HA=blenda com hidroxiapatita; ALM=blenda com alumina; QTS=quitosana; ZRC=blenda com zircônia.

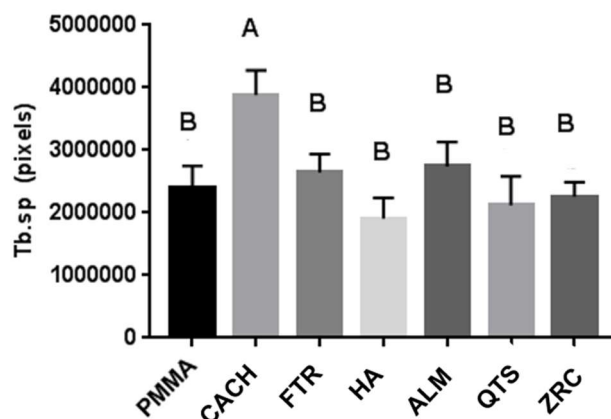
*Letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados obtidos quanto ao número de trabéculas por unidade de comprimento (Tb.N) foram submetidos ao teste ANOVA um fator e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos das blendas de hidroxiapatita e quitosana em relação ao PMMA ($p > 0,05$), que apresentaram os maiores valores médios de número de trabéculas (Tb.N). Entretanto, foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos PMMA e CACH, fosfato tricálcico, alumina e zircônia.

Os dados da estatística descritiva relativa ao espaçamento trabecular (Tb.Sp) obtido por meio da μ TC estão representados na figura 12.

Figura 12 – Gráfico dos valores médios (pixels) e desvio padrão ($\pm$) do espaçamento trabecular (Tb.Sp) para os diferentes grupos.



Legenda: PMMA=cimento de polimetilmetacrilato; CACH=cimento de aluminato de cálcio homogêneo; FTR=blenda com fosfato tricálcico; HA=blenda com hidroxiapatita; ALM=blenda com alumina; QTS=quitosana; ZRC=blenda com zircônia.

*Letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados obtidos quanto ao espaçamento trabecular (Tb.Sp) foram submetidos ao teste ANOVA um fator e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de blendas (fosfato tricálcico, hidroxiapatita, alumina, quitosana e zircônia) em relação ao PMMA ($p > 0,05$). Entretanto, foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo CACH em relação aos demais grupos, apresentando o maior valor médio de espaçamento trabecular.

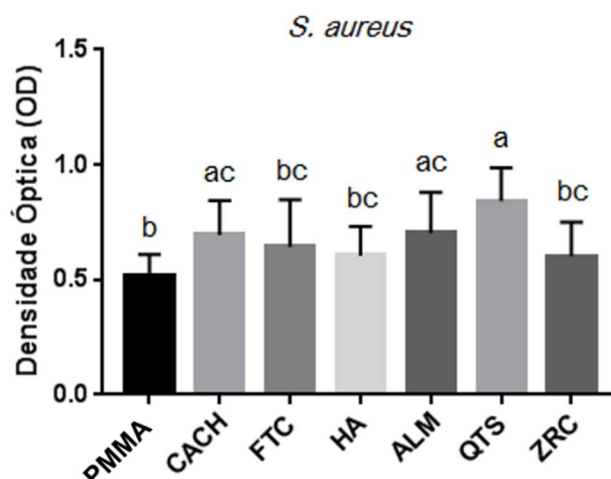
4.2 Formação de biofilmes microbianos

A análise de variância (ANOVA - 1 critério) detectou diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$) para cada análise de formação de biofilme microbiano monotípico realizada.

O teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para identificar diferenças significativas entre os grupos. Os valores médios de densidade óptica (DO) da formação de biofilmes microbianos monotípicos de *S. aureus*, *S.*

mutans e *P. aeruginosa*, e o desvio padrão (DP) de cada grupo estão elucidados abaixo.

Figura 13 – Gráfico dos valores médios (DO) e desvio padrão ($\pm$) de formação de biofilme de *S. aureus* dos diferentes grupos.



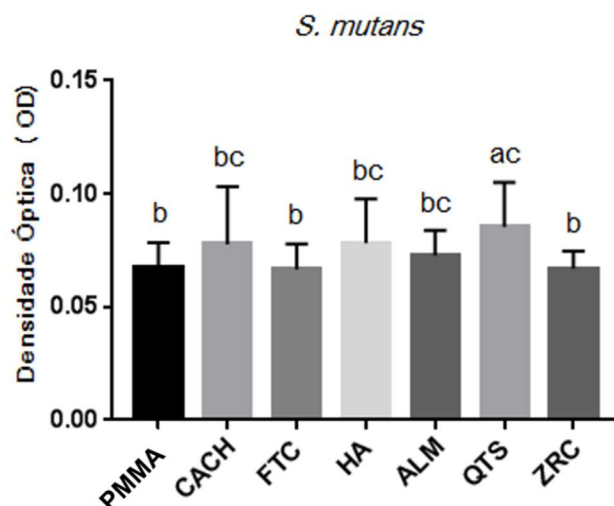
Legenda: PMMA=cimento de polimetilmetacrilato; CACH=cimento de aluminato de cálcio homogêneo; FTC=blenda com fosfato tricálcico; HA=blenda com hidroxiapatita; ALM=blenda com alumina; QTS=quitosana; ZRC=blenda com zircônia.

*Letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os resultados obtidos na formação de biofilme microbiano monotípico de *S. aureus* mostraram diferenças significativas entre os grupos (Figura 13). O grupo com valor médio de densidade óptica mais elevada foi o quitosana (QTS), diferindo estatisticamente dos grupos controle (CTL), hidroxiapatita (HA), zircônia (ZRC) e fosfato tricálcico (FTC) ($p < 0,05$), que apresentaram resultados semelhantes.

Figura 14 – Gráfico dos valores médios (DO) e desvio padrão ($\pm$) de formação de biofilme de *S. mutans* dos diferentes grupos.



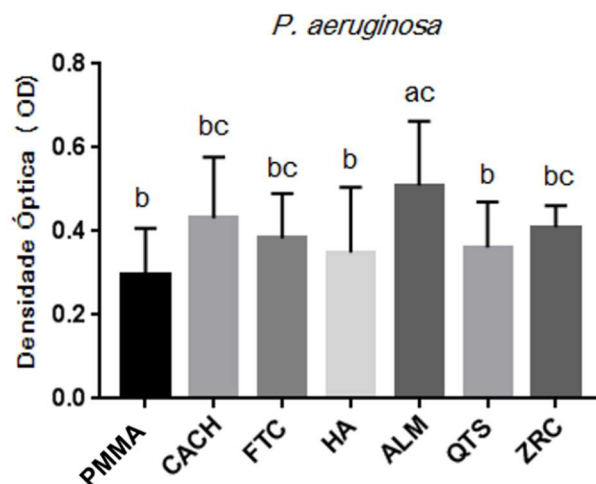
Legenda: PMMA=cimento de polimetilmetacrilato; CACH=cimento de aluminato de cálcio homogêneo; FTC=blenda com fosfato tricálcico; HA=blenda com hidroxiapatita; ALM=blenda com alumina; QTS=quitosana; ZRC=blenda com zircônia.

*Letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: elaborada pelo autor.

No ensaio com *S. mutans*, os resultados mostraram diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) (Figura 14). Entretanto, todos os grupos apresentaram resultados semelhantes ao grupo controle (CTL), exceto o grupo quitosana (QTS).

Figura 15 – Gráfico dos valores médios (DO) e desvio padrão ($\pm$) de formação de biofilme de *P. aeruginosa* dos diferentes grupos.



Legenda: PMMA=cimento de polimetilmetacrilato; CACH=cimento de aluminato de cálcio homogêneo; FTR=blenda com fosfato tricálcico; HA=blenda com hidroxiapatita; ALM=blenda com alumina; QTS=quitosana; ZRC=blenda com zircônia.

*Letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os resultados da última análise de formação de biofilme monotípico foram de *P. aeruginosa* e mostraram diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) (Figura 15). O grupo com valor médio de densidade óptica superior foi alumina (ALM), diferindo estatisticamente dos grupos controle (CTL), quitosana (QTS) e hidroxiapatita (HA), que apresentaram resultados semelhantes. Os demais grupos apresentaram resultados que não diferiram entre si ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos a neoformação óssea em defeitos confeccionados em fêmures de ratos, os quais foram preenchidos com cimentos injetáveis não-reabsorvíveis. Também avaliamos a formação microbiana *in vitro*, utilizando amostras em discos padronizados, com *S. aureus*, *S. mutans* e *P. aeruginosa*. O intuito foi contribuir com inovação verificando a viabilidade inicial de uso de novos cimentos injetáveis como biomateriais, promovendo e facilitando a proliferação do tecido ósseo, inclusive como substituto do mesmo. Foram avaliados 07 tipos diferentes de cimentos injetáveis, sendo 05 novas composições, denominados de blendas, uma vez que foram compostos à base de cimento de aluminato de cálcio, com aditivos de hidroxiapatita, fosfato tricálcico, alumina, zircônia e quitosana.

Para a verificação da neoformação óssea na interface osso-biomaterial, utilizamos o ensaio por microtomografia computadorizada, após um período pós-cirúrgico de 30 dias. A microtomografia computadorizada por raios X é uma técnica não invasiva que permite avaliar a neoformação e qualidade óssea, por meio de imagens tridimensionais (Nogueira et al., 2010). A análise por microtomografia computadorizada, realizada nesse estudo, permitiu nos inferir como se deu a neoformação óssea nos defeitos confeccionados nos fêmures de ratos.

Por meio de uma análise conjunta e minuciosa de todos os parâmetros avaliados nesse estudo quanto a neoformação óssea, e em comparação aos resultados obtidos com PMMA, verificou-se que as blendas com hidroxiapatita, quitosana e zircônia foram as que mais apresentaram potencial em reparo de defeitos ósseos, sendo as blendas mais promissoras nesse aspecto. Os resultados dos cimentos experimentais demonstraram grande potencial para competição com o cimento de PMMA, sendo um possível substituto do mesmo em cirurgias de defeito ósseo para reparo, onde se faz necessário ou como opção clínica, de uso de cimentos ortopédicos.

Recentes estudos também avaliaram biomateriais onde há uma atuação conjunta de substâncias junto ao cimento de aluminato de cálcio a fim de uma melhor bioatividade, osseointegração, além de análises relativas à

biocompatibilidade (Acuña-Gutiérrez et al., 2016; Huck et al., 2017; Castro-Raucci et al., 2017, 2018). Nestes estudos os autores puderam inferir promissores resultados quanto à viabilidade de uso de diferentes compostos, agregando bioatividade de células osteogênicas e biocompatibilidade.

Embora o cimento de polimetilmetacrilato (PMMA) seja amplamente utilizado na ortopedia e em cirurgias ósseas, alguns estudos também têm visado a agregação de aditivos em sua composição, ou em utilização agregada a outros biomateriais, a fim de serem obtidas melhorias em suas propriedades, além de minimizar os inconvenientes para a sua utilização (Cuijpers et al., 2014; Puska et al., 2016; Cui et al., 2017; Cimatti et al., 2018; Sangeetha et al., 2018).

Acuña-Gutiérrez et al. (2017) estudaram o efeito das adições de LiCl (cloreto de lítio) em relação à bioatividade *in vitro*, hemólise, citotoxicidade, resistência à compressão e tempo de endurecimento de cimentos de aluminato de cálcio. Os resultados encontrados indicaram que a blenda proveniente da adição de solução de LiCl na concentração de 0,010M apresentou alta resistência à compressão, bioatividade, citotoxicidade e baixo tempo de preparo, indicando potencial como cimento ósseo.

Castro-Raucci et al. (2017) avaliaram as implicações na adição de 2,8% e 10% de cloreto de cálcio (CaCl_2) em cimento de aluminato de cálcio (CAC) com radiopacificadores de óxido de bismuto (Bi_2O_3) e óxido de zinco (ZnO) em culturas de células osteogênicas, encontrando resultados que demonstraram que o CAC com 10% de CaCl_2 pode promover o reparo ósseo no contexto de terapias endodônticas.

Neste presente estudo, o acréscimo de diferentes aditivos potenciais para melhorar as propriedades biológicas nas formulações de cimentos à base de aluminato de cálcio, também foi utilizado visando sua aplicação como substituto ósseo, conforme os estudos acima citados.

Em suma, encontramos bons resultados de neoformação óssea quanto ao uso de blendas à base de cimento de aluminato de cálcio após 30 dias. Resultado semelhante em uma composição à base do mesmo cimento foi encontrado no estudo de Garcia et al. (2015), onde realizaram análise histológica e histomorfométrica, com excelentes resultados nos valores de neoformação óssea para os períodos de 30 e 90 dias após cirurgias de preenchimento.

Oliveira et al. (2017) estudaram *in vitro* blendas de CAC com 4% em peso de diferentes aditivos (alumina, zircônia, óxido de zinco, fosfato tricálcico ou hidroxiapatita), que em contato com solução de fluido corporal simulado, apresentaram precipitação de apatita na superfície dos materiais. Além disso, a viabilidade celular osteoblástica também foi avaliada, com resultados que mostraram que blendas com colágeno, óxido de zinco e zircônia apresentaram melhores resultados quando comparadas a produtos comerciais utilizados em odontologia e ortopedia visando reparo ósseo. Este estudo também encontrou excelentes resultados para a blenda com zircônia, que também apresenta a mesma concentração em peso.

A blenda com hidroxiapatita apresentou excelentes resultados nesse estudo, haja visto que a hidroxiapatita é um material que vem sendo amplamente usado em agregações de biomateriais a fim de promover a regeneração óssea. A hidroxiapatita é essencialmente interessante pela sua bioatividade e por conferir dureza a biomateriais (Venkatesan et al., 2014; Bhardwaj et al., 2018; Rahmati, Khodabakhshi, 2018). Nossos resultados mostraram que a blenda de cimento de aluminato de cálcio com hidroxiapatita exibiu os maiores valores nos parâmetros volume ósseo e na proporção entre volume ósseo e volume total, sendo que no parâmetro de número de trabéculas não diferiu estatisticamente do grupo que apresentou maior valor que foi o grupo preenchido com PMMA. Diversos estudos prévios e recentes que utilizaram hidroxiapatita visando regeneração óssea relataram que há benefícios na sua utilização (Bhardwaj et al., 2018; Geng et al., 2018; Rahmati, Khodabakhshi, 2018; Sancilio et al., 2018), estando de acordo com os resultados deste obtidos neste estudo.

A análise para formação de biofilmes microbianos monotípicos, faz-se extremamente relevante frente aos frequentes relatos e estudos sobre infecções pós-cirúrgicas em tecido ósseo, inclusive agregadas ao uso de biomateriais (Ferrando et al., 2017; Junka et al., 2017; Butini et al., 2018; Ferry et al., 2018; Stravinskas et al., 2018; Yang et al., 2018).

Comparando entre os resultados de formação de biofilme de três tipos de micro-organismos utilizados nesse estudo, foi verificado maiores valores na análise com *S. aureus*, seguidos por *P. aeruginosa* e *S. mutans*, respectivamente. Os resultados demonstram a relevância e potencial infeccioso e agregador de *S.*

aureus, principalmente. Este achado está em consonância com o estudo de Tuon et al. (2018), onde *Staphylococcus aureus* foram identificados em 34% das amostras de isolados de pacientes com infecções do sítio cirúrgico relacionados à trauma ortopédico, sendo o micro-organismo mais prevalente.

Para cada micro-organismo avaliado, uma blenda exibiu a maior quantidade de viabilidade, sendo que em todos os testes, o grupo controle (PMMA) foi aquele que apresentou menor quantidade de micro-organismos viáveis. Por outro lado, o grupo de blenda com quitosana apresentou os maiores valores de formação de biofilme para as análises com *S. aureus* e *S. mutans*, diferindo do grupo PMMA ($p < 0,05$). Esse resultado contraria as expectativas de que esse grupo apresentasse valores bem inferiores na formação de biofilmes, principalmente pela já reportada ação antibacteriana da quitosana (Bano et al., 2017; Verlee et al., 2017). Tal fato pode ser explicado pela baixa concentração desse aditivo na blenda experimental, 1% de peso. Além disso, o teste utilizado *in vitro*, não nos fornece uma garantia para afirmar que essa blenda estaria mais propícia a infecções pós-cirúrgicas em uso para reparo de defeitos ósseos. Entretanto, na análise com *P. aeruginosa*, a blenda com quitosana apresentou um dos menores valores, não diferindo do grupo PMMA ($p > 0,05$), demonstrando menor formação de biofilme desse micro-organismo em relação às outras blendas.

O cimento de PMMA apresentou ótimos resultados nas análises de formação de biofilmes monotípicos, já que exibiu os menores valores, demonstrando ser um material menos propício à formação de biofilme. Contudo, as blendas experimentais de fosfato tricálcico, hidroxiapatita e zircônia apresentaram excelentes resultados, uma vez que apresentaram o mesmo potencial de agregação bacteriana, para as espécies utilizadas, que o cimento PMMA.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste estudo e análise detalhada dos mesmos, pode-se concluir que as blendas à base de cimento de aluminato de cálcio com hidroxiapatita e zircônia apresentam potencial para utilização como substitutos ósseos uma vez que promovem maior neoformação óssea na interface e não alteram a formação de biofilmes microbianos monotípicos de *S. aureus*, *S. mutans* e *P. aeruginosa*, quando comparadas ao PMMA.

REFERÊNCIAS*

- Acuña-Gutiérrez IO, Escobedo-Bocardo JC, Almanza-Robles JM, Cortés-Hernández DA, Saldívar-Ramírez MM, Reséndiz-Hernández PJ, et al. Development of LiCl-containing calcium aluminate cement for bone repair and remodeling applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Jan 1;70(1):357-363. doi: 10.1016/j.msec.2016.09.022. PubMed PMID: 27770903.
- Alves HL, Santos LA, Bergmann CP. Influência de aditivos na injetabilidade de cimento ósseo de fosfato tricálcico. *Matéria*. 2006;11(3):324-31. doi: 10.1590/S1517-70762006000300022.
- Arancibia MY, Alemán A, Calvo MM, López-Caballero ME, Montero P, Gómez-Guillén MC. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. *Food Hydrocoll*. 2014 Mar;35:710–7. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.08.026.
- Askari E, Mehrali M, Metselaar IH, Kadri NA, Rahman MM. Fabrication and mechanical properties of functionally graded material by electrophoretic deposition. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012 Aug;12:144–50. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.02.029. PubMed PMID: 22732480.
- Bano I, Arshad M, Yasin T, Ghauri MA, Younus M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *Int J Biol Macromol*. 2017 Apr;102:380–3. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047. PubMed PMID: 28412341.
- Bhardwaj VA, Deepika PC, Basavarajaiah S. Zinc Incorporated Nano Hydroxyapatite: A Novel Bone Graft Used for Regeneration of Intrabony Defects. *Contemp Clin Dent*. 2018 Jul-Sep;9(3):427-433. doi: 10.4103/ccd.ccd_192_18. PubMed PMID: 30166839.
- Buchholz HW, Engelbrecht H. Depots effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. *Chirurg*. 1970;41:511–5. PubMed: 5487941.
- Burger CP, Moraes PC, Maniscalco CL, Borges PA, Batista PA, Canola JC, et al. Cimento de aluminato de cálcio: uso em defeitos ósseos induzidos em fêmur de coelhos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2013 Jun;65(3):757-62. doi: 10.1590/S0102-09352013000300022.
- Butini ME, Cabric S, Trampuz A, Di Luca M. In vitro anti-biofilm activity of a biphasic gentamicin-loaded calcium sulfate/hydroxyapatite bone graft substitute. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018 Jan 1;161:252-260. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.10.050. PubMed PMID: 29096369.
- Castro-Raucci LM, Teixeira LN, Oliveira IR, Raucci-Neto W, Jacobovitz M, Rosa AL, et al. Osteogenic cell response to calcium aluminate-based cement. *Int Endod J*. 2017 Aug;50(8):771-779. doi: 10.1111/iej.12682. PubMed PMID: 27521570.

* 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

Castro-Raucci LMS, Teixeira LN, Barbosa AFS, Fernandes RR, Raucci-Neto W, Jacobovitz M, et al. Calcium chloride-enriched calcium aluminate cement promotes in vitro osteogenesis. *Int Endod J*. 2018 Jun;51(6):674-683. doi: 10.1111/iej.12883. PubMed PMID: 29226342.

Cimatti B, Santos MAD, Brassesco MS, Okano LT, Barboza WM, Nogueira-Barbosa MH, et al. Safety, osseointegration, and bone ingrowth analysis of PMMA-based porous cement on animal metaphyseal bone defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Feb;106(2):649-658. doi: 10.1002/jbm.b.33870. PubMed PMID: 28276202.

Corbi SC, Neto RS, Junior EM, Marcantonio RA. Caracterização radiográfica ex vivo de biomateriais utilizados para regeneração óssea em mandíbulas de porcos. *Rev. Odontol UNESP*. 2012 May/Jun;41(3):169-76.

Cui X, Huang C, Zhang M, Ruan C, Peng S, Li L, et al. Enhanced osteointegration of poly(methylmethacrylate) bone cements by incorporating strontium-containing borate bioactive glass. *J R Soc Interface*. 2017 Jun;14(131). pii: 20161057. doi: 10.1098/rsif.2016.1057. PubMed PMID: 28615491.

Cuijpers VMJI, Jaroszewicz J, Anil S, Al Farraj Aldosari A, Walboomers XF, Jansen JA. Resolution, sensitivity, and in vivo application of high-resolution computed tomography for titanium-coated polymethyl methacrylate (PMMA) dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Mar;25(3):359-365. doi: 10.1111/clr.12128. PubMed PMID: 23421533.

Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater*. 2008;24(3):299–307. doi: 10.1016/j.dental.2007.05.007. PubMed PMID: 17659331.

Dion I, Rouais F, Baquey C, Lahaye M, Salmon R, Trut L, et al. Physico-chemistry and cytotoxicity of ceramics. *J Mater Sci Mater Med*. 1997 May;8(5):325-32. PubMed PMID: 15348756.

Elkholy S, Yahia S, Awad M, Elmessiery M. In vivo evaluation of β -CS/n-HA with different physical properties as a new bone graft material. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018 Feb 26. doi: 10.1111/cid.12599. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 29479806.

Engqvist H, Persson T. T, Lööf J, Faris A, Hermansson L. Chemical stability of a novel injectable bioceramic for stabilisation of vertebral compression fractures. *Trends Biomater Artif Organs*. 2008;21(2):98–106.

Ferrando A, Part J, Baeza J. Treatment of Cavitary Bone Defects in Chronic Osteomyelitis: Bioglass S53P4 vs. Calcium Sulphate Antibiotic Beads. *J Bone Jt Infect*. 2017 Oct 9;2(4):194-201. doi: 10.7150/jbji.20404. eCollection 2017. PubMed PMID: 29119078.

Ferry T, Boucher F, Fevre C, Perpoint T, Chateau J, Petitjean C, et al. Innovations for the treatment of a complex bone and joint infection due to XDR *Pseudomonas aeruginosa* including local application of a selected cocktail of bacteriophages. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Jul 27. doi: 10.1093/jac/dky263. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 30060002.

García-Garduño MV, Reyes-Gasgay J. [La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica]. *Tip Ver Espec en Ciencias Químico-Biológicas*. 2006;9(2):90–5. Spanish.

Garcia LFR, Huck C, Scardueli CR, Alberto C, Costa DS. Repair of Bone Defects Filled with New Calcium Aluminate. *J. Endod. Elsevier Ltd*. 2015;41(6):864–70. doi: 10.1016/j.joen.2014.12.029. PubMed PMID: 25720982.

Geng Z, Wang X, Zhao J, Li Z, Ma L, Zhu S, Liang Y, Cui Z, He H, Yang X. The synergistic effect of strontium-substituted hydroxyapatite and microRNA-21 on improving bone remodeling and osseointegration. *Biomater Sci*. 2018 Aug 28. doi: 10.1039/c8bm00716k. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 30151515.

Hermansson, L., Höglund, U., Olaisson, E., Thomsen, P., Engqvist, H. Comparative study of the behaviour of a novel injectable bioceramic in sheep vertebrae. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*. 2008;(22):138-143.

Hermansson L. Nanostructural Chemically Bonded Ca-Aluminate Based Bioceramics. *Biomaterials - Physics and Chemistry*, Prof. Rosario Pignatello (Ed.), InTech. 2011;47-74. doi: 10.5772/24411.

Hollinger JO, Battistone GC. Biodegradable bone repair materials. *Clin Orthop Relat Res*. 1986 Jun;(207):290-305. PubMed PMID: 3522015.

Hsu YH, Hu CC, Hsieh PH, Shih HN, Ueng SW, Chang Y. Vancomycin and Ceftazidime in Bone Cement as a Potentially Effective Treatment for Knee Periprosthetic Joint Infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2017 Feb 1;99(3):223-231. doi: 10.2106/JBJS.16.00290. PubMed PMID: 28145953.

Huang XN, Nicholson OS. Mechanical properties and fracture toughness of α -Al₂O₃-platelet-reinforced γ -PSZ composites at room and high temperatures. *J Am Ceram Soc*. 1993 May;76(5):1294–1301. doi: 10.1111/j.1151-2916.1993.tb03754.x.

Huck C, Barud HD, Basso FG, Costa CA, Hebling J, Garcia LD. Cytotoxicity of New Calcium Aluminate Cement (EndoBinder) Containing Different Radiopacifiers. *Braz Dent J*. 2017 Jan-Feb;28(1):57-64. doi: 10.1590/0103-6440201701023. PubMed PMID: 28301019.

Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Relat Res*. 1981 Jun;(157):259-78. PubMed PMID: 7018783.

Jarcho M. Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications. *Dent Clin North Am*. 1992 Jan;36(1):19-26. PubMed PMID: 1310651.

Junka A, Szymczyk P, Ziółkowski G, Karuga-Kuzniewska E, Smutnicka D, Bil-Lula I, et al. Bad to the Bone: On In Vitro and Ex Vivo Microbial Biofilm Ability to Directly Destroy Colonized Bone Surfaces without Participation of Host Immunity or Osteoclastogenesis. *PLoS One*. 2017 Jan 11;12(1):e0169565. doi: 10.1371/journal.pone.0169565. PubMed PMID: 28076372.

Kimura M, Sorata Y, Yanome S, Hideshima O, Yokomoto M, Tekikou S, et al. Study of root canal cements comprising calcium aluminate. First report on cytotoxicity. *Shoni Shikagaku Zasshi*. 1991;29(1):44-54. PubMed PMID: PMID: 1784865. Japanese.

Kopanda JE, MacZura G. Production processes, properties, and applications for calcium aluminate cements. In: Hart LD, editor. *Alumina Chemicals Science and Technology Handbook*. Westerville (OH): The American Ceramic Society; 1990. p.171-84.

Koseki H, Yonekura A, Shida T, Yoda I, Horiuchi H, Morinaga Y. Early staphylococcal biofilm formation on solid orthopaedic implant materials: in vitro study. *Plos One*. 2014;9(10):1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0107588. PubMed PMID: 25299658.

Kraft L. Calcium aluminate based cement as dental restorative materials [tese]. Uppsala (Suécia): Acta Universitatis Upsaliensis; 2002.

Minelli EB, Della Bora T, Benini A. Different microbial biofilm formation on polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement loaded with gentamicin and vancomycin. *Anaerobe*. 2011;17(6):380–3. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.03.013. PubMed PMID: 21515396.

Mobasherpour I, Solati Hashjin M, Razavi Toosi SS, Darvishi Kamachali R. Effect of the addition $ZrO_2-Al_2O_3$ on nanocrystalline hydroxyapatite bending strength and fracture toughness. *Ceram Int*. 2009;35(4):1569–74. doi: 10.1016/j.ceramint.2008.08.017.

Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*. 2001 Jun;71(6):354–61. doi: 10.1046/j.1440-1622.2001.02128.x. PubMed PMID: 11409021.

Mostafa TB, Darwish AS. An approach toward construction of tuned chitosan/polyaniline/metal hybrid nanocomposites for treatment of meat industry wastewater. *Chem Eng J*. 2014 May;243:326-39. doi: 10.1016/j.cej.2014.01.006.

Nogueira LP, Braz D, Barroso RC, Oliveira LF, Pinheiro CJ, Dreossi D, Tromba L. 3D histomorphometric quantification of trabecular bones by computed microtomography using synchrotron radiation. *Micron*. 2010 Dec;41(8):990-6. doi: 10.1016/j.micron.2010.06.013. PubMed PMID: 20673730.

Oliveira IR, Raniero LJ, Leite VMC, Castro-Raucci LMS, de Oliveira PT, Pandolfelli VC. In vitro apatite-forming ability of calcium aluminate blends. *Ceram Int.* 2017 May 4. doi: 10.1016/j.ceramint.2017.05.026. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 29479806.

Parreira RM, Andrade TL, Luz AP, Pandolfelli VC, Oliveira IR. Calcium aluminate cement-based compositions for biomaterial applications. *Ceram Int.* 2016;42:11732-8. doi: 10.1016/j.ceramint.2016.04.092.

Prakasam M, Locs J, Salma-Ancane K, Loca D, Largeteau A, Berzina-Cimdina L. Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review. *J Funct Biomater.* 2015 Dec;6(4):1099–140. doi: 10.3390/jfb6041099. PubMed PMID: 26703750.

Puska M, Moritz N, Aho AJ, Vallittu PK. Morphological and mechanical characterization of composite bone cement containing polymethylmethacrylate matrix functionalized with trimethoxysilyl and bioactive glass. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016 Jun;59:11-20. doi: 10.1016/j.jmbbm.2015.12.016. PubMed PMID: 26741375.

Rahmati R, Khodabakhshi F. Microstructural evolution and mechanical properties of a friction-stir processed Ti-hydroxyapatite (HA) nanocomposite. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018 Aug 22;88:127-139. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.08.025. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 30170192.

Sancilio S, Gallorini M, Di Nisio C, Marsich E, Di Pietro R, Schweikl H, et al. Alginate/Hydroxyapatite-Based Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Improve Dental Pulp Biomineralization and Differentiation. *Stem Cells Int.* 2018 Aug 2;2018:9643721. doi: 10.1155/2018/9643721. eCollection 2018. PubMed PMID: 30154869.

Sangeetha R, Madheswari D, Priya G. Fabrication of poly (methyl methacrylate)/Ce/Cu substituted apatite/Egg white (Ovalbumin) biocomposite owning adjustable properties: Towards bone tissue rejuvenation. *J Photochem Photobiol B.* 2018 Aug 16;187:162-169. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.08.015. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30170286.

Sawada K, Nakahara K, Haga-Tsujimura M, Iizuka T, Fujioka-Kobayashi M, Igarashi K, et al. Comparison of three block bone substitutes for bone regeneration: long-term observation in the beagle dog. *Odontology.* 2018 Mar 20. doi: 10.1007/s10266-018-0352-7. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 29557992.

Syedmajidi S, Rajabnia R, Syedmajidi M. Evaluation of antibacterial properties of hydroxyapatite/bioactive glass and fluorapatite/bioactive glass nanocomposite foams as a cellular scaffold of bone tissue. *J Lab Physicians.* 2018 Jul-Sep;10(3):265-270. doi: 10.4103/JLP.JLP_167_17. PubMed PMID: 30078960.

Shirazi FS, Mehrali M, Oshkour AA, Metselaar HSC, Kadri NA, Abu Osman NA. Mechanical and physical properties of calcium silicate/alumina composite for biomedical engineering applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014 Feb;30:168–75. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.10.024. PubMed PMID: 24316872.

Smith IDM, Milto KM, Doherty CJ, Amyes SGB, Simpson AHRW, Hall AC. A potential key role for alpha-haemolysin of *Staphylococcus aureus* in mediating chondrocyte death in septic arthritis. *Bone Joint Res*. 2018 Aug 4;7(7):457-467. doi: 10.1302/2046-3758.77.BJR-2017-0165.R1. eCollection 2018 Jul. PubMed PMID: 30123495.

Soares GD, coordenador. Materiais avançados no Brasil 2010-2022. In: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Brasília (DF): CGEE; 2010. p. 297-334.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012 Oct;7(10):1918-29.

Stravinskas M, Nilsson M, Horstmann P, Petersen MM, Tarasevicius S, Lidgren L. Antibiotic Containing Bone Substitute in Major Hip Surgery: A Long Term Gentamicin Elution Study. *J Bone Jt Infect*. 2018 Apr 12;3(2):68-72. doi: 10.7150/jbji.23901. eCollection 2018. PubMed PMID: 29761068.

Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface*. 2009;6(3):311–24. doi:10.1098/rsif.2008.0448.focus.

Tuon FF, Cieslinski J, Ono AFM, Goto FL, Machinski JM, Mantovani LK, Kosop LR, Namba MS, Rocha JL. Microbiological profile and susceptibility pattern of surgical site infections related to orthopaedic trauma. *Int Orthop*. 2018 Aug 2. doi: 10.1007/s00264-018-4076-7. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 30069593.

Vasile BS, Oprea O, Voicu G, Ficai A, Andronescu E, Teodorescu A, et al. Synthesis and characterization of a novel controlled release zinc oxide/gentamicin-chitosan composite with potential applications in wounds care. *Int J Pharm*. 2014 Mar;463(2):161–9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.035. PubMed PMID: 24291078.

Venkatesan J, Kim SK. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering - A review. *J Biomed Nanotechnol*. 2014 Oct;10(10):3124–40. doi: 10.1166/jbn.2014.1893. PubMed PMID: 25992432.

Verlee A, Mincke S, Stevens CV. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr Polym*. 2017;164:268–83. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.02.001. PubMed PMID: 28325326.

Yang Y, Chu L, Yang S, Zhang H, Qin L, Guillaume O, et al. Dual-functional 3D-printed composite scaffold for inhibiting bacterial infection and promoting bone regeneration in infected bone defect models. *Acta Biomater*. 2018 Aug 18. pii: S1742-7061(18)30482-3. doi: 10.1016/j.actbio.2018.08.015. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 30125670.

ANEXO A — Comitê de Ética



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 07/2017, intitulado: "Avaliação de blendas à base de cimento de aluminato de cálcio como substituto ósseo: Estudo in vivo e microbiológico" sob a responsabilidade de **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS**, tendo como orientado a aluna da Pós-Graduação-Mestrado **KAIKE LESSA CAMPORÊS** e que envolva a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.859 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 23/06/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/06/2017 a 30/03/2018
Espécie/inhagem/raça	Camundongo heterogêneo Wistar
Nº de Animais	40
Peso/idade	300 grs / 90 dias
Sexo	MACHO
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 23 de junho de 2017


Profa. Dra. PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO
 Coordenadora

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Denys
 CEP: 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
 Fax: (12) 3947-9010 / gndes@fosjc.unesp.br / bokomori@fosjc.unesp.br