



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

**NATHALIA DE SOUZA RAMOS**

**BLENDAS DE CIMENTO DE POLIMETILMETACRILATO  
(PMMA) CONTENDO ZIRCÔNIA E ALUMINATO DE  
CÁLCIO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

2022

**NATHALIA DE SOUZA RAMOS**

**BLENDAS DE CIMENTO DE POLIMETILMETACRILATO (PMMA)  
CONTENDO ZIRCÔNIA E ALUMINATO DE CÁLCIO PARA  
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

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: Patologia Bucal. Linha de pesquisa: Inflamação e Reparação Tecidual.

Orientadora: Profa. Assoc. Luana M. R. de Vasconcellos

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Eduardo Oliveira

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. 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).

Ramos, Nathalia de Souza

Blendas de cimento de polimetilmetacrilato (PMMA) contendo zircônia e aluminato de cálcio para aplicações biomédicas / Nathalia de Souza Ramos. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.  
48 f.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientador: Felipe Eduardo Oliveira

1. Biomateriais. 2. Cimentos ósseos. 3. Osteogênese. 4. PMMA. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de, orient. II. Oliveira, Felipe Eduardo, 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 M. R. de Vasconcellos** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituição de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Luciane Dias de Oliveira**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituição de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Dr. José Antonio Silveira Neves**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituição de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 29 de Agosto de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP, mesmo em tempos de pandemia e lockdown, é uma universidade maravilhosa e cheia de oportunidades.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**, na pessoa da coordenadora Prof<sup>a</sup> Assoc. Luciane Dias Oliveira. E aos alunos que me ajudaram muito quando não pude estar presencialmente, em especial à aluna **Juliana Lupp**.

A minha orientadora **Prof<sup>a</sup> Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos** por ter me acolhido, foi uma orientadora maravilhosa que sempre esteve disposta a me ajudar.

Ao meu coorientador **Prof Dr. Felipe Eduardo Oliveira**. Obrigada por ser esse profissional incrível, além de um grande amigo.

A **Prof<sup>a</sup> Dra. Ivone Regina de Oliveira** da Universidade do Vale do Paraíba

(Univap) pela colaboração com o projeto.

Aos meus pais Ivanete e Marcelo, por sempre me darem apoio em minhas decisões, e pelo incentivo em continuar com os meus estudos sempre, não importa onde e nem quando, quero ser motivo de orgulho para vocês. E aos meus amigos mais próximos, muito obrigada por serem minha base de apoio quando precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela Concessão de Bolsa CAPES. (Número de processo : CAPES: 8888.529141/2020-00 e CAPES: 88887.497398/2020-00)

## SUMÁRIO

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO.....                                                                               | 7  |
| ABSTRACT.....                                                                             | 9  |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                        | 11 |
| 2 PROPOSIÇÃO .....                                                                        | 15 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                | 16 |
| 3.1 Caracterização das Amostras .....                                                     | 18 |
| 3.2 Ensaios biológicos <i>in vitro</i> .....                                              | 20 |
| 3.2.1 Determinação da viabilidade celular .....                                           | 23 |
| 3.2.2 Análise do conteúdo de proteína total .....                                         | 23 |
| 3.2.3 Atividade da fosfatase alcalina .....                                               | 24 |
| 3.2.4 Análise da formação de nódulos de mineralização .....                               | 25 |
| 3.2.5 Teste de genotoxicidade.....                                                        | 26 |
| 3.2.6 Análise da morfologia celular por MEV .....                                         | 27 |
| 3.3 Método de análise de dados .....                                                      | 28 |
| 4 RESULTADO.....                                                                          | 29 |
| 4.1 Testes de caracterização das amostras.....                                            | 29 |
| 4.1.1 Análise da topografia superficial das amostras (MEV) .....                          | 29 |
| 4.1.2 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....                                     | 31 |
| 4.1.3 Espectroscopia de infravermelho por transformação de <i>Fourier</i><br>(FT-IR)..... | 33 |
| 4.2 Ensaios biológicos <i>in vitro</i> .....                                              | 34 |

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.2.1 Determinação da viabilidade celular .....</b>                                       | <b>34</b> |
| <b>4.2.2 Conteúdo de proteína total.....</b>                                                 | <b>35</b> |
| <b>4.2.3 Atividade de fosfatase alcalina .....</b>                                           | <b>36</b> |
| <b>4.2.4 Análise de formação de nódulos de mineralização e quantificação de cálcio .....</b> | <b>37</b> |
| <b>4.2.5 Análise de morfologia celular por MEV .....</b>                                     | <b>38</b> |
| <b>4.2.6 Teste de genotoxicidade.....</b>                                                    | <b>39</b> |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>                                                                     | <b>40</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>                                                                     | <b>44</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                      | <b>45</b> |



Ramos NS. Blendas de polimetilmetacrilato (PMMA) contendo zircônia e aluminato de cálcio para aplicações biomédicas [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp). Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

## RESUMO

A engenharia de tecidos e de regeneração tecidual óssea tornou-se uma área muito importante para o desenvolvimento de materiais alternativos funcionais para restaurar, manter ou melhorar a função de um tecido danificado. Atualmente, com o grande avanço tecnológico na área da ciência, o desenvolvimento e aprimoramento de biomateriais tornou-se necessário para a evolução de melhores biomateriais que irão contribuir na melhora da qualidade de vida da população. Dessa forma, o objetivo neste estudo foi avaliar a influência dos aditivos de aluminato de cálcio e de zircônia no cimento ósseo de polimetilmetacrilato (PMMA) na osteogênese *in vitro* com células obtidas de fêmures de ratos. Após produção das amostras, foi realizada a caracterização utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de dispersão de energia e infravermelho por transformação de EDS (FT-IR). Posteriormente à caracterização, as amostras foram submetidas aos testes biológicos *in vitro* utilizando células mesenquimais obtidas de fêmures de ratos. As células foram isoladas e plaqueadas com as amostras visando avaliar a influência dos biomateriais na atividade e diferenciação celular de osteoblastos. Após períodos pré-determinados, foram realizados os testes de citotoxicidade, atividade de fosfatase alcalina, produção de proteína total, formação dos nódulos de mineralização, genotoxicidade e proliferação celular. A caracterização por MEV- FE mostrou que as amostras apresentaram características morfológicas topográficas modificadas, Na superfície do PMMA observam-se partículas maiores quando comparado com as blendas. O EDS demonstrou que as amostras evidenciam a presença de elementos químicos que compõem o biomaterial, em quantidades diferentes. A espectroscopia de infravermelho por transformação de Fourier (FT-IR) evidenciou a composição das amostras com ligações químicas semelhantes, sem evidência dos elementos aditivos. Os resultados dos testes celulares mostraram que as amostras não foram citotóxicas e permitiram a atividade, adesão e diferenciação celular, porém não houve diferença estatística entre os grupos experimentais e o controle nos testes de citotoxicidade, proteína total e fosfatase alcalina ( $p>0,05$ ). Nas imagens de MEV das amostras do grupo PMMA sugere-se menos células, enquanto as amostras dos grupos PMMA+CAC e PMMA+Z sugeriram mais células na superfície das amostras. Na contagem de micronúcleos do teste de genotoxicidade, o grupo de amostras de PMMA+CAC mostrou menor quantidade de micronúcleos comparado a todos os grupos, e as amostras de

PMMA+Z mostraram mais micronúcleos formados. Concluiu-se que as amostras produzidas com os aditivos (aluminato de cálcio e zircônia), são promissoras devido a ausência de toxicidade e por permitirem a diferenciação celular.

Palavras-chave: Biomateriais. Cimentos ósseos. Osteogênese. PMMA.

Ramos NS. Polymethylmethacrylate (PMMA) cement blends containing zirconia and calcium aluminate for biomedical applications [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

## **ABSTRACT**

Tissue engineering and bone tissue regeneration has become a very important area for the development of functional alternative materials to restore, maintain or improve the function of damaged tissue. Currently, with the great technological advance in the area of science, the development and improvement of biomaterials has become necessary for the evolution of better biomaterials that will contribute to the improvement of the population's quality of life. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of calcium aluminate and zirconia additives in polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement on in vitro osteogenesis with cells obtained from rat femurs. After sample production, characterization was performed using scanning electron microscopy (SEM), energy dispersion spectroscopy and EDS transformation infrared (FT-IR). After characterization, the samples were submitted to in vitro biological tests using mesenchymal cells obtained from rat femurs. The cells were isolated and plated with the samples in order to evaluate the influence of biomaterials on the activity and cell differentiation of osteoblasts. After predetermined periods, cytotoxicity, alkaline phosphatase activity, total protein production, formation of mineralization nodules, genotoxicity and cell proliferation were performed. The characterization by SEM-FE showed that the samples showed modified topographic morphological characteristics. On the surface of the PMMA larger particles are observed when compared to the blends. The EDS showed that the samples show the presence of chemical elements that make up the biomaterial, in different quantities. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) The composition of the samples showed similar chemical bonds, with no evidence of additive elements. The results of the cellular tests showed that the samples were not cytotoxic and allowed cell activity, adhesion and differentiation, but there was no statistical difference between the experimental groups and the control in the cytotoxicity, total protein and alkaline phosphatase tests ( $p > 0.05$ ). The SEM images of the samples from the PMMA group suggested fewer cells, while the samples from the PMMA+CAC and PMMA+Z groups suggested more cells on the surface of the samples. In the micronucleus count of the genotoxicity test, the group of PMMA+CAC samples showed a lower amount of micronuclei compared to all groups, and the PMMA+Z samples showed more micronuclei formed. It was concluded that the samples produced with the additives (calcium aluminate and

*zirconia) are promising due to the absence of toxicity and for allowing cell differentiation.*

*Keywords: Biomaterials. Bone cements. Osteogenesis. PMMA.*

## 1 INTRODUÇÃO

A regeneração óssea é um processo fisiológico complexo e bem orquestrado de formação óssea, que pode ser observada durante a consolidação das fraturas, e também está envolvida na remodelação contínua ao longo da vida adulta. O osso possui a capacidade intrínseca de regeneração como parte do processo de reparo em resposta a lesões (Dimitriou et al., 2011).

Os biomateriais têm sido vistos como uma potencial alternativa aos procedimentos de enxerto padrões para alcançar a regeneração óssea clinicamente bem-sucedida (Thrivikraman et al., 2019). É amplamente reconhecido que os biomateriais podem ser adaptados para regular o microambiente em que as células residem durante o processo de formação de novo osso. Os biomateriais são biocompatíveis, o que permitem a migração, proliferação e diferenciação de células residentes ou distribuídas externamente, que são utilizadas para promover a formação de osso novo (Thrivikraman et al., 2019).

A prevalência de doenças e distúrbios esqueléticos está aumentando devido ao envelhecimento da população. Os cimentos ósseos à base de polimetilmetacrilato (PMMA) são amplamente usados no tratamento dessas doenças. Especificamente, eles são usados para fixar implantes metálicos e restaurar espinhas, ossos e articulações fraturados ou doentes (Hamajima et al., 2020; Saleh et al., 2016).

O cimento ósseo é fornecido principalmente como um sistema de dois componentes compostos de um polímero de polimetacrilato de metila em pó (PMMA) e um monômero de metacrilato de metila (MMA) líquido. (Hamajima et al., 2020; Saleh et al., 2016). A manipulação destes

componentes pode ser um problema devido a sua reação exotérmica durante a polimerização, uma vez que as temperaturas dentro dos cimentos ósseos em polimerização podem atingir 75 a 95°C, o que pode conduzir a necrose óssea focal e interferência local na circulação sanguínea. A liberação imediata ou gradual de monômeros que não reagiram é citotóxica e tóxica para os tecidos. (Hamajima et al., 2020). O estresse oxidativo induzido pela produção de radicais livres durante a polimerização de PMMA pode ser uma causa primária dos efeitos tóxicos causados por cimentos ósseos. Os radicais livres gerados a partir da polimerização da resina acrílica induzem estresse oxidativo e causam citotoxicidade diretamente (Hamajima et al., 2020; Tsukimura et al., 2009).

Estudos têm mostrado que a adição de partículas de cerâmica bioativas (como preenchedores) ao cimento ósseo de PMMA pode melhorar o desempenho biológico do cimento ósseo e reduzir a temperatura de reação (Liu et al., 2019; Sugita et al., 2020; Yang et al., 2015).

Os materiais à base de aluminato de cálcio (CAC) exibem, devido suas características únicas de presa/endurecimento e microestrutura, um grande potencial como substituto ósseo (Hermansson, 2011). Este cimento é promissor por apresentar características físico-químicas favoráveis, como coeficiente térmico adequado e composição química semelhante ao dente e osso humano, mas também pela sua bioatividade, como sua capacidade de formar uma camada de apatita biologicamente ativa após exposição aos fluidos corporais (Burger et al., 2013; Messias et al., 2020). As biocerâmicas de aluminato de cálcio pertencem às cerâmicas quimicamente ligadas, que são usualmente apresentadas ou conhecidas como cimentos inorgânicos (Hermansson, 2011).

O estudo do aluminato de cálcio (CAC) tem o intuito de usá-lo na rotina da cirurgia ortopédica, visto que sua biocompatibilidade já fora

comprovada em testes realizados na odontologia (Burger et al., 2013). O aluminato de cálcio (CAC) como biomaterial vem sendo avaliado há mais de duas décadas quanto às propriedades físicas, mecânicas e biocompatíveis gerais. Os materiais à base de aluminato de cálcio exibem, devido às suas características únicas de cura/endurecimento e microestrutura relacionada, um grande potencial dentro do campo de biomateriais (Hermansson, 2011). Sua principal vantagem é o menor tempo de endurecimento, aliado à maior resistência mecânica, quando comparado com outros materiais já destinados para esse fim (Burger et al., 2013).

Os materiais que têm como base o aluminato de cálcio possuem algumas características adicionais que despertam o interesse para sua aplicação na ortopedia e na odontologia, sua alta viscosidade facilita a injeção direta no local logo após sua manipulação, e sua baixa reação exotérmica o tornam mais biocompatível (Burger et al., 2013; Hermansson, 2011).

Outro elemento bioativo que pode ser associado a materiais de substitutos ósseos é a zircônia ( $\text{ZrO}_2$ ).

A zircônia ( $\text{ZrO}_2$ ) é um dióxido policristalino cerâmico do metal de transição zircônio (Zr). A zircônia de grau biomédico foi introduzida há 20 anos para resolver o problema da fragilidade da alumina e a conseqüente falha potencial dos implantes (Chevalier, 2006). A principal questão da cerâmica de zircônia, não só em ortopedia, é a sua sensibilidade à degradação a baixa temperatura, que tem sido associada à rugosidade dos implantes após a esterilização a vapor (Chevalier, 2006).

A zircônia ( $\text{ZrO}_2$ ) é considerada um material estrutural devido ao fato de que, quando submetida a tensões, pode alterar sua microestrutura, melhorando seu desempenho mecânico (Özcan et al., 2016). As zircônias, sendo as mais fortes das cerâmicas odontológicas, estão sendo cada vez

mais fabricadas em forma monolítica para uma variedade de aplicações clínicas (Zhang, Lawn, 2018). Possui excelentes propriedades mecânicas e biológicas, como baixa corrosão, toxicidade e aderência bacteriana, por isso vêm sendo incorporada em biomateriais (Denry, Kelly, 2008; Dion et al. 1997).

Por um lado, a zircônia de grau biomédico apresenta as melhores propriedades mecânicas das cerâmicas de óxido: isso é consequência do endurecimento por transformação de fase, que aumenta sua resistência à propagação de trincas. Por outro lado, o envelhecimento químico, a chamada degradação a baixa temperatura, pode ocorrer na presença de água à temperatura ambiente devido a transformação de fase, que induz tensões de compressão (Chevalier, 2006; Zhang, Lawn, 2018).

A composição de CAC incorporado com zircônia foi utilizada para estabilização de fraturas de compressão vertebral, e foi apresentado níveis de resistência à compressão semelhante ao PMMA (Engqvist et al., 2007). Um estudo realizado por Vasconcellos et al. (2019), concluiu que as blendas de zircônia são promissoras para uso em obturações para regeneração óssea.

Diferentes cimentos ósseos são usados em cirurgias invasivas tanto na ortopedia quanto na odontologia para o preenchimento ósseo (Alves et al., 2006; Engqvist et al., 2007). Dessa forma, o desenvolvimento de estudos e pesquisas que melhorem as propriedades biomecânicas e biológicas dos materiais, são necessários para exercerem a função de reparar e substituir o tecido ósseo com excelência, trazendo bem-estar e qualidade de vida para a população.



## **2 PROPOSIÇÃO**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a influência dos aditivos de aluminato de cálcio e zircônia no cimento ósseo de polimetilmetacrilato (PMMA) na osteogênese *in vitro*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos foram analisar *in vitro*:

- a) a citotoxicidade e a morfologia celular;
- b) o conteúdo de proteína total e a atividade da fosfatase alcalina;
- c) a formação de nódulos de mineralização e quantificação de cálcio;
- d) a genotoxicidade.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em conjunto com a Professora Dra. Ivone Regina de Oliveira, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). As amostras de cimento de PMMA (Biomecanica, Jaú, Brasil) foram preparadas conforme instruções do fabricante para o preparo do cimento. O monômero foi vertido sobre o pó e em seguida realizada a espatulação para obter uma mistura homogênea (Figura 1). A seguir esta mistura foi vertida em moldes de silicone com formato de pastilhas, no tamanho de 6mm de diâmetro por 2mm de altura (Figura 2).

As blendas são compostas do cimento de PMMA acrescido dos pós de aluminato de cálcio ou de zircônia. Inicialmente foi preparado o cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CACH) por meio da mistura a seco de cimento de aluminato de cálcio (CAC) com dispersante poliglicol (Bayer, 0,6%-p) e plastificante  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Labsynth, 2,8%-p) em moinho de bolas durante 1 hora. Previamente a espatulação, foram pesados 7,5% de peso de cada um dos aditivos acima citados (Schmidt-Malan et al., 2019), os quais foram misturados ao pó e ao líquido do cimento de PMMA. Estes componentes foram espatulados e vertidos em moldes de silicone com formato de pastilhas, no tamanho de 6mm de diâmetro por 2mm de altura.

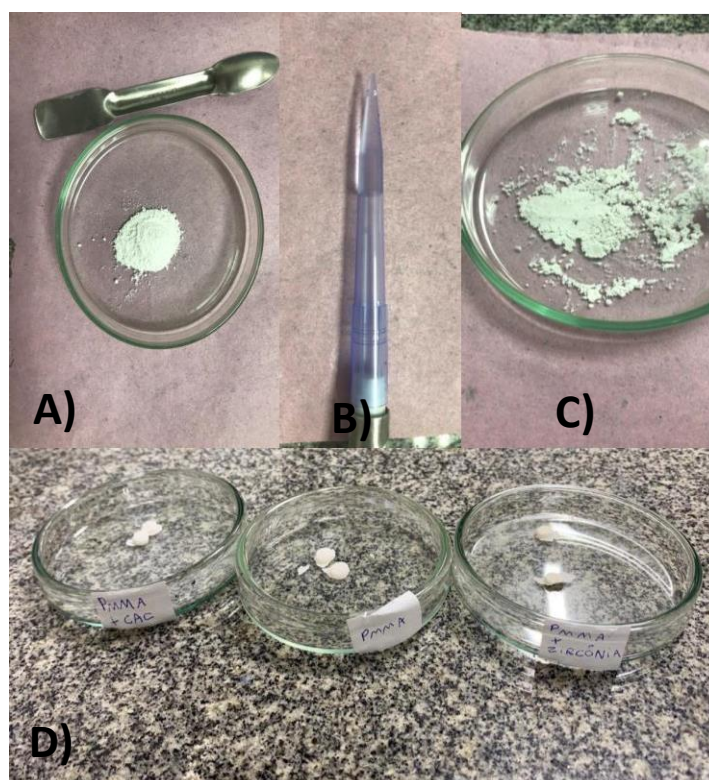
Independente do grupo (Quadro 1), as amostras foram removidas dos moldes após completa cura e esterilizadas em estufa a 120°C por 1 hora. Para cada grupo foi utilizado um molde específico, visando não haver incorporação de resíduos nas amostras preparadas.

Figura 1 - Apresentação comercial do cimento ortopédico de polimetilmetacrilato (PMMA)



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 2 – Confecção das amostras de PMMA



Legenda: Produção das amostras: A) pó do PMMA; B) monômero do PMMA; C) espatulação para mistura do pó e do monômero; D) amostras finalizadas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 1 – Divisão dos grupos

| <b>GRUPOS</b>                                    |     |
|--------------------------------------------------|-----|
| Cimento de PMMA (controle)                       | P   |
| Cimento de PMMA + cimento de aluminato de Cálcio | CAC |
| Cimento de PMMA + pó de Zircônia                 | Zr  |

Fonte: elaborado pela autora.

### 3.1 Caracterização das amostras

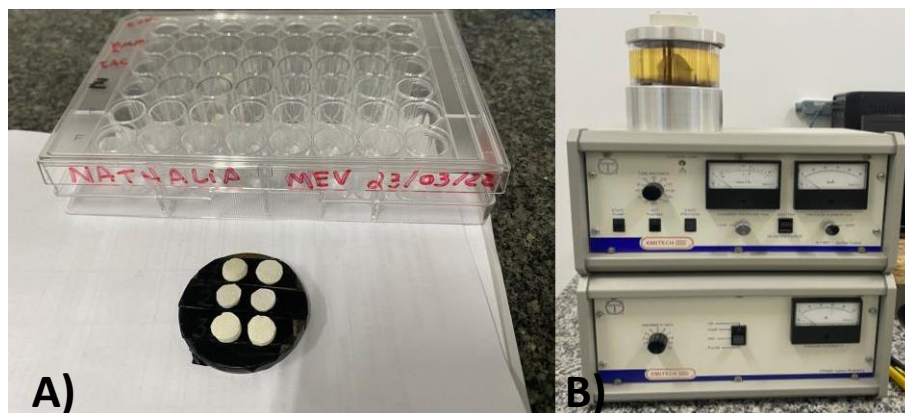
Os seguintes testes foram realizados para caracterizar morfológicamente as amostras:

#### a) Análise da topografia superficial das amostras:

Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL/JSM-5310, Tóquio, Japão) com canhão de emissão de campo “Field Emission Gun” (FEG) (Tescan/Vega 3, Brno, República Tcheca) instalados no Laboratório de Materiais Dentários no campus da Unesp. Para isso, as amostras foram posicionadas em uma plataforma de alumínio (stub), auxiliado por uma fita dupla face de carbono (Figura 3A) (3M, SumaréSP, Brasil) e metalizadas com uma camada fina de ouro (80 Å), que foi depositado por meio de vaporização iônica (sputtering) na máquina metalizadora (Figura B) (Emitech SC 7620, Sputter Coater, Quorum Technologies, Newhaven, Reino Unido) por 130 s com

uma corrente de 10-15 miliâmpères (mA) em vácuo de 130 mTorr e à uma taxa de metalização de 3.5 nm/min. As imagens foram obtidas no MEV com detector de elétrons secundários (ES), projetados sobre a superfície da amostra.

Figura 3 - Amostras e máquina metalizadora



Legenda: a) amostras posicionadas na fita de carbono; b) máquina metalizadora  
Fonte: Elaborado pela autora.

#### **a) Análise qualitativa da composição química dos elementos químicos das amostras:**

Foi utilizado um espectrômetro por dispersão de energia (EDS) (Bruker Nano GmbH 410, Berlin, Alemanha) associado ao software Espirit 1.9 (Bruker, Berlin, Alemanha) no MEV (Inspect S50, FEI Company, Brno, República Tcheca) instalado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE).

#### **b) Espectroscopia de infravermelho por transformação de *Fourier* (FTIR):**

A composição química da superfície das partículas foi analisada utilizando o espectrômetro de infravermelho por transformação de *Fourier*

(FT-IR) (Parkin Elmer, modelo Spectrum GX) no modo UATR, instalado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE), na região do médio 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ , 32 varreduras e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  utilizando o programa *Spectrum Saurch Plus*

### **3.1 Ensaios biológicos *in vitro*.**

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP sob o número 19/2020, e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

Todos os procedimentos biológicos *in vitro* foram desenvolvidos e executados no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC) localizado no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho - Unesp, Campus de São José dos Campos.

Nove ratos pesando cerca de 300g com 90 dias de idade foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico utilizando uma solução intramuscular de Anasedan/Dopalen. As células foram obtidas dos fêmures desses ratos de acordo com Maniopoulos et al., 1988. Após a limpeza dos fêmures, foram colocados em solução de transporte contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutamina ( $\alpha$ -MEM – Gibco- Life Technologies, NY, USA), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (Gibco- Life Technologies, NY, USA). No fluxolaminar, as extremidades foram removidas e culturas primárias de osteoblastos foram

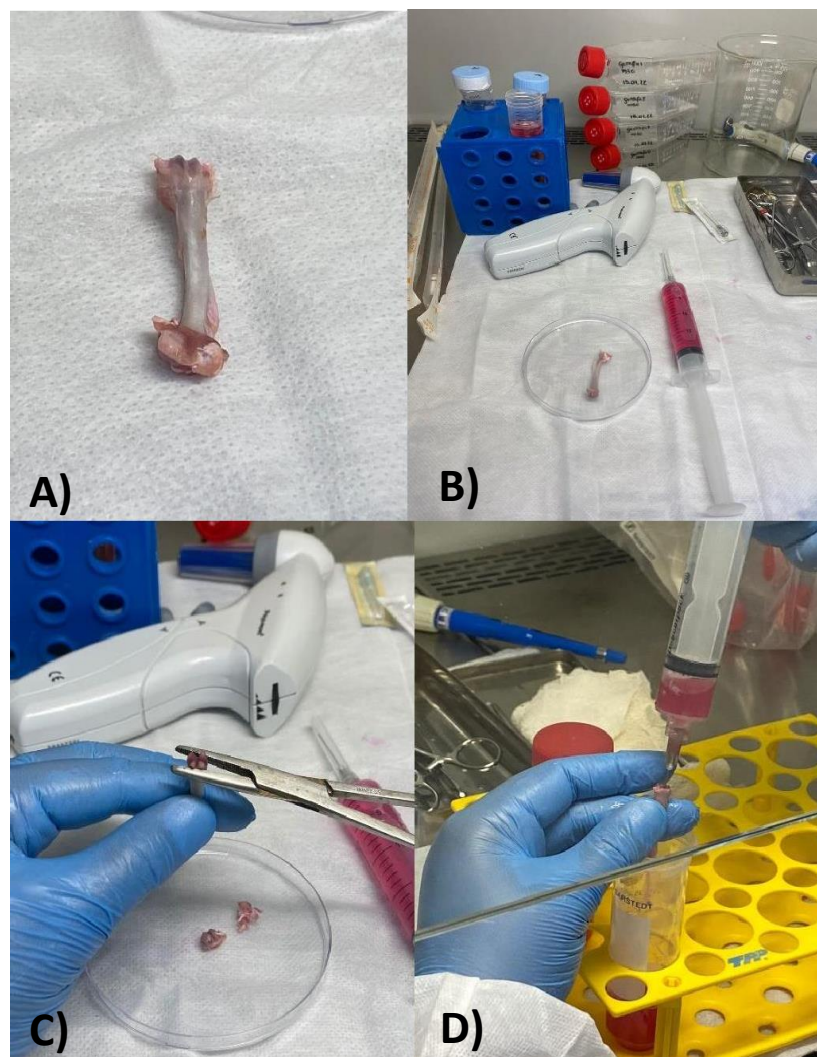
isoladas a partir das células obtidas pela lavagem da medula óssea dos fêmures, utilizando meio de cultura suplementado contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutamina ( $\alpha$ -MEM – Gibco- Life Technologies, NY, USA), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (Gibco- Life Technologies, NY, USA) (Figura 4). Posteriormente estas células foram distribuídas em frascos para cultura (Kasvi, São Jose dos Pinhais, Paraná, Brazil) e incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (Incubadora Ultrasafe HF 212 UV). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany).

Após a confluência (aproximadamente 7 dias), as células foram liberadas enzimaticamente e plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células viáveis em poços da microplaca de 48 poços (Kasvi, São Jose dos Pinhais, Paraná, Brazil). Previamente ao plaqueamento, as amostras do cimento de PMMA (P), PMMA + cimento de aluminato de cálcio (CAC) e PMMA + pó de zircônia (Zr) foram inseridas no interior dos poços. Em seguida, foi acrescentado 300  $\mu$ L de meio de cultura osteogênico na placa, que foi produzido a partir da adição de 5 mg/mL de ácido ascórbico (Neon) e 2,16g de  $\beta$  glicerol-fosfato (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) na solução de 500 mL do meio de cultura celular suplementado citado acima. O grupo controle do experimento é representado por meio do plaqueamento apenas das células no poço da placa, sem qualquer biomaterial no poço. O meio de cultura osteogênico foi trocado a cada 3 dias.

Após estes procedimentos, todas as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e mantidas até o momento dos testes. Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993-1 e em triplicata, sendo que cada triplicata é um pool de células provenientes dos fêmures de 3 animais de cada grupo. Os procedimentos para as análises propostas a seguir, estão detalhadamente descritas nos artigos prévios do nosso grupo de pesquisa (Andrade et al., 2015;

Prado et al, 2018).

Figura 4 – Isolamento celular



Legenda: A) fêmur do rato; B) fêmur no fluxo antes de ser preparado para a lavagem; C) extremidade do fêmur sendo removida; D) lavagem da medula óssea dos fêmures.  
Fonte: Elaborado pela autora.



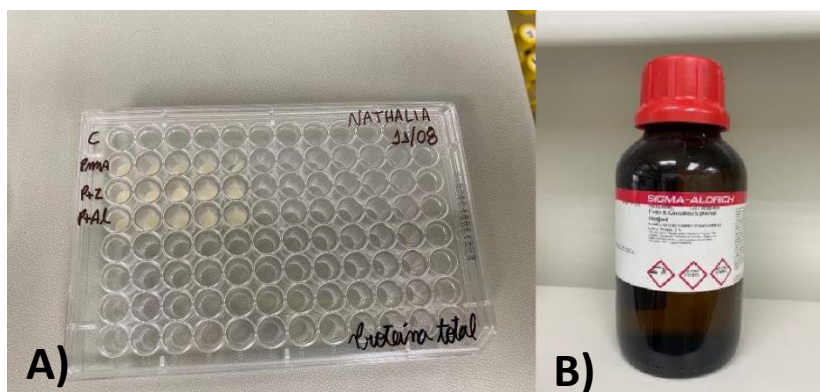
### **3.1.1 Determinação da viabilidade celular**

Foi realizada avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição e incubação com o corante MTT [brometo de 3-4,5-dimetiltiazol] (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) utilizando análise espectrofotométrica do corante incorporado. Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas após o período de 5 dias, utilizando medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU).

### **3.1.2 Análise do conteúdo de proteína total**

O conteúdo de proteína total foi calculado após 07 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes, com PBS a 37°C, e preenchidos com 2 mL de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich), para extração das proteínas. Após 30 min, 1 mL da solução de cada poço foi misturada com 1 mL da solução de Lowry (SigmaAldrich) e deixado por 20 min à temperatura ambiente. A esta mistura foi acrescentado 1mL de reagente de Folin e Ciocalteau(Sigma-Aldrich) e deixado por 30 min à temperatura ambiente (Figura 5). A seguir, a absorbância foi aferida a 680 nm em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900). Após a finalização do teste, os dados foram expressos em absorbância.

Figura 5 – Teste de proteína total



Legenda: a) placa do teste de proteína total; b) reagente de Folin e Ciocalteu (Sigma-Aldrich).

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.1.3 Atividade da Fosfatase Alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial (Figura 6) de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica), utilizando os mesmos lisados do teste da proteína total após os períodos de 07 dias. Inicialmente, 50  $\mu\text{L}$  de timolftaleína monofosfato serão misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1. A solução foi acrescentada alíquota de 50  $\mu\text{L}$  dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 min a 37°C em banho-maria. Para o desenvolvimento de cor, serão adicionados 2 mL de do reagente 3 composto por  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. A absorbância será medida em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) utilizando comprimento de onda de 590 nm. Os dados foram expressos em absorbância.

Figura 6 – Apresentação comercial do kit de fosfatase alcalina

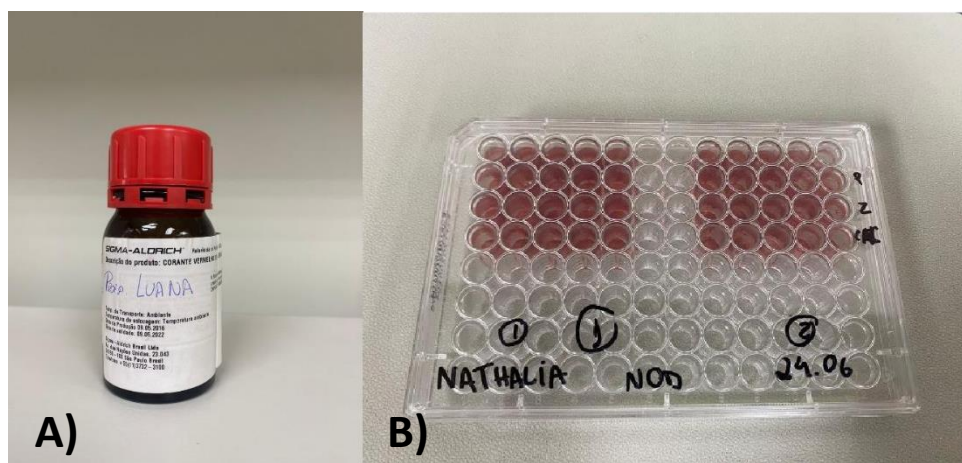


Legenda: Kit comercial de fosfatase alcalina.  
Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.1.4 Análise de formação de nódulos de mineralização

Após 14 dias do plaqueamento celular, foi verificada a formação de nódulos de mineralização utilizando a coloração por vermelho de Alizarina S 2% (Sigma- Aldrich Chemical, St Louis, USA) e observação ao microscópio (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany) (Figura 7).

Figura 7 – Teste de nódulos de mineralização



Legenda: A) Corante vermelho de alizarina; B) placa teste de nódulos.  
Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.1.5 Teste de genotoxicidade

Para avaliar o dano nuclear presente nas células mesenquimais, foi avaliado nos períodos de 3 e 10 dias e utilizado o teste de micronúcleos, que foi realizado de acordo com o guideline de OECD atualizado em 2014 (TG487). As células mesenquimais obtidas dos fêmures foram cultivadas em meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutaminha ( $\alpha$ -MEM – Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Para o teste,  $3 \times 10^5$  células foram cultivadas em lâminas de vidro em 4 mL de meio celular por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, incubadas com citocalasina B (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) na concentração de 6  $\mu$ g/mL por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> para inibir citocinese e induzir o acúmulo de células binucleadas. As células foram submetidas ao choque hipotônico e

fixadas em solução de metanol: ácido acético (3:1) por 10 min (procedimento repetido 3 vezes). Após secagem, as células foram coradas em Giemsa-Wright a 5% por 6 minutos. Os micronúcleos foram analisados em microscópio de imersão (100X), sendo que foram avaliadas 2.000 células/placa (Figura 8) por concentração em pelo menos dois experimentos independentes. Os micronúcleos foram identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma claramente separados do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear e incluindo uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal. Foram contadas as células com menos de cinco micronúcleos.

Figura 8- Placa do teste de genotoxicidade



Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.1.6 Análise da morfologia celular por MEV

Após 3 e 7 dias de cultivo, a morfologia celular foi avaliada por FE-SEM (Field Emission Microscopia Eletrônica de Varredura) (Zeiss - EVO MA10, São

Paulo, Brasil). As amostras foram lavadas três vezes com PBS para remover as células não aderentes e, em seguida, foram fixadas quimicamente com paraformaldeído a 4% à temperatura ambiente durante 20 min. A seguir as amostras, foram desidratadas por meio de uma série ascendente de etanol e antes da análise, e revestidas com uma fina camada de ouro usando um sistema sputter-revestimento.

### 3.2 Método de análise de dados

Todos os dados obtidos nos testes *in vitro* (MTT, fosfatase Alcalina, conteúdo de proteína total ) foram plotados e inicialmente analisados pelo teste de normalidade *Shapiro-Wilk* ( $p=0,05$ ) seguido por teste paramétrico de análise de variância ANOVA-um fator ( $p=0,05$ ), considerando como variáveis os grupos e os períodos analisados. Quando necessário, foram submetidos ao teste *pos-hoc* de *Tukey*.

Todos os testes foram realizados com o auxílio do software *GraphPad Prism* 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e para todos os testes estatísticos foi adotado nível de significância de 5%.

## **4 RESULTADO**

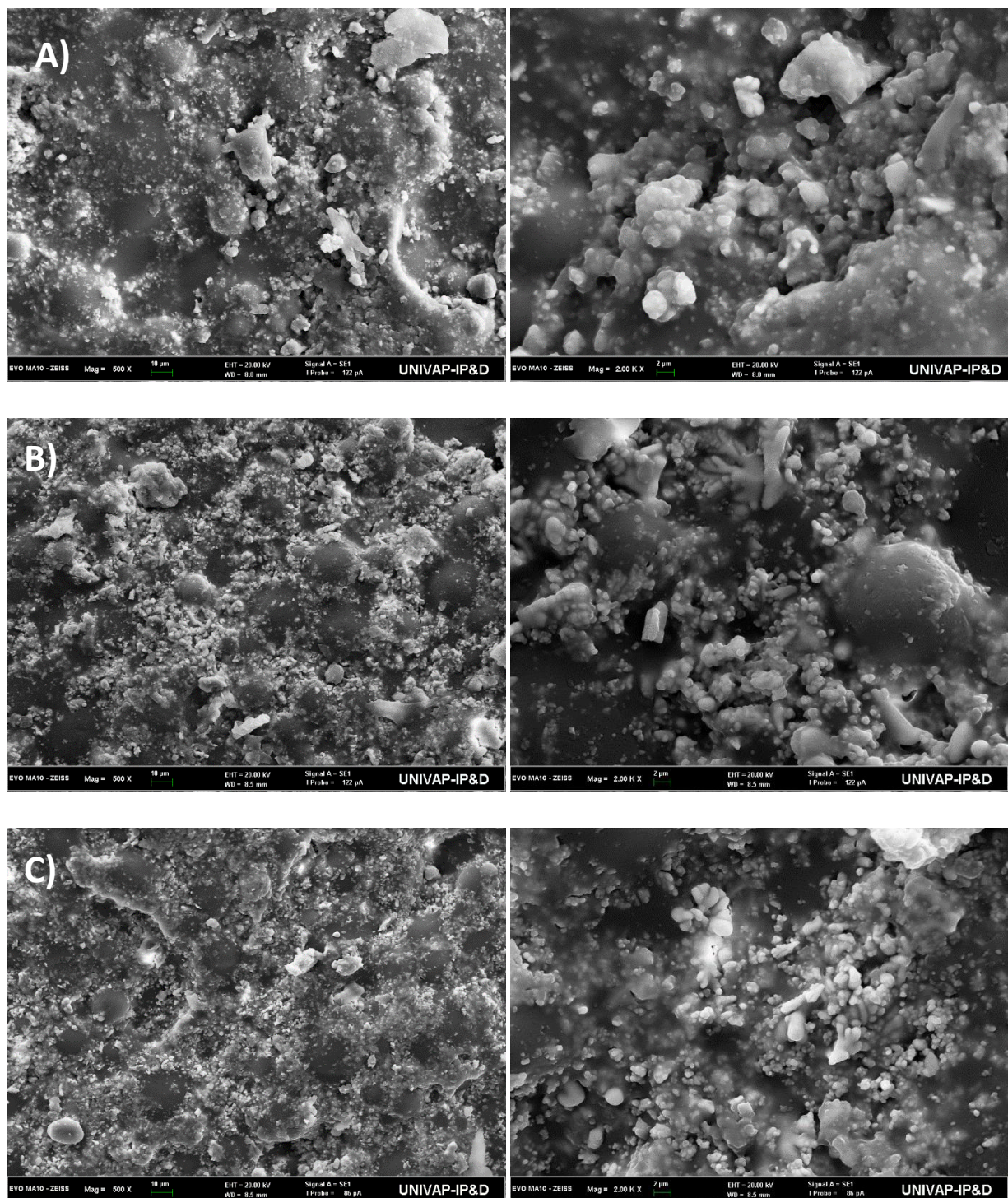
### **4.1 Testes de caracterização das amostras**

#### **4.1.1 Análise da topografia superficial das amostras (MEV)**

Nas micrografias obtidas por MEV- FE, respectivamente nos aumentos de 500x e 2000x, foi possível observar na figura 9 que a morfologia das superfícies se difere. Na superfície do PMMA observam-se partículas maiores quando comparado com as blendas.



Figura 9 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura



Legenda: A) amostra do grupo PMMA; B) amostras do grupo PMMA+CAC; C) amostras do grupo PMMA+Z.

Fonte: Elaborado pela autora.

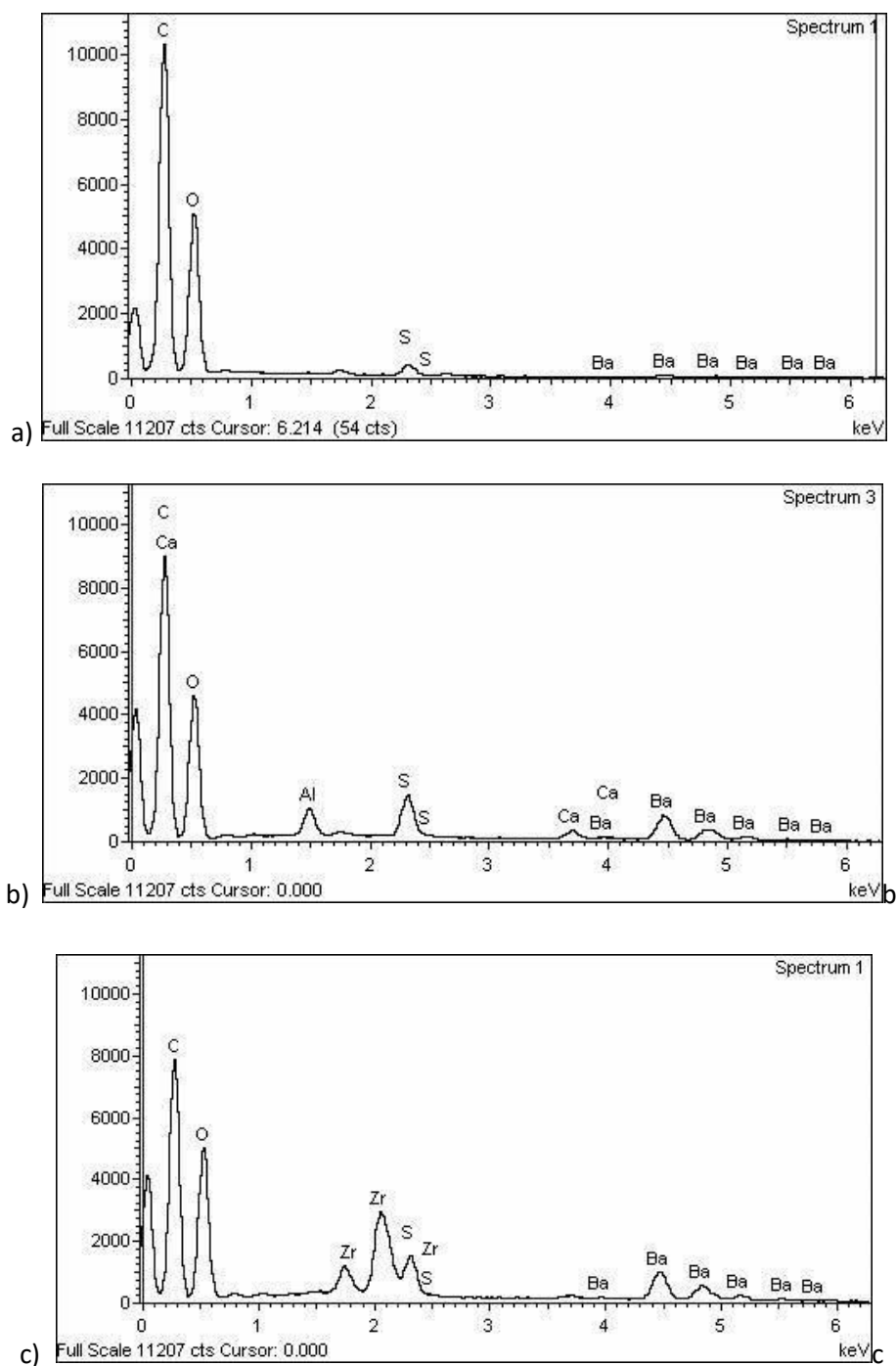


#### 4.1.2 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Na espectroscopia por dispersão de energia (EDS) uma amostra de cada grupo foi analisada para verificar os elementos químicos constituintes da mesma. Nas amostras de PMMA quando avaliadas por EDS, evidenciou-se a presença de elementos químicos que compõem biomaterial, sendo principalmente observados picos de energia característicos dos elementos (C- Carbono, O- Oxigênio; S – Enxofre e Ba- Bário) (Figura 10).

Nas amostras da blenda PMMA+CAC quando avaliadas por EDS, evidenciou-se a presença de elementos químicos que compõem biomaterial, sendo principalmente observados picos de energia característicos dos elementos C- Carbono, O- Oxigênio; S – Enxofre, Ba- Bário; Ca- Cálcio e Al- Aluminato. Nas amostras da blenda PMMA+Z quando avaliadas por EDS, evidenciou-se a presença de elementos químicos que compõem biomaterial, sendo principalmente observados picos de energia característicos dos elementos C- Carbono, O- Oxigênio; S – Enxofre, Ba- Bário; Ca- Cálcio e Z- Zircônia.

Figura 10- Difratograma da microanálise por espectroscopia por dispersão de energia



Legenda: EDS da amostra: a) PMMA; b) PMMA-aluminato; c) PMMA-zircônia  
 Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados obtidos a partir da mensuração dos elementos químicos no EDS estão ilustrados no quadro 2.

Quadro 2-Valores das médias obtidas em cada amostra

|               | Wt%      |          |         |         |         |         |         |
|---------------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|               | C        | O        | S       | Ba      | Ca      | Al      | Zr      |
| <b>PMMA</b>   | 51,7±0,1 | 46,5±0,4 | 0,7±0,2 | 1,2±0,4 | -       | -       | -       |
| <b>PMMA+C</b> | 49,9±0,3 | 41,7±3,7 | 1,8±0,5 | 5,4±2,5 | 0,4±0,2 | 1,0±0,3 | -       |
| <b>PMMA+Z</b> | 50,8±0,8 | 33,2±1,9 | 1,6±0,1 | 6,8±1,2 | -       | -       | 7,7±0,9 |

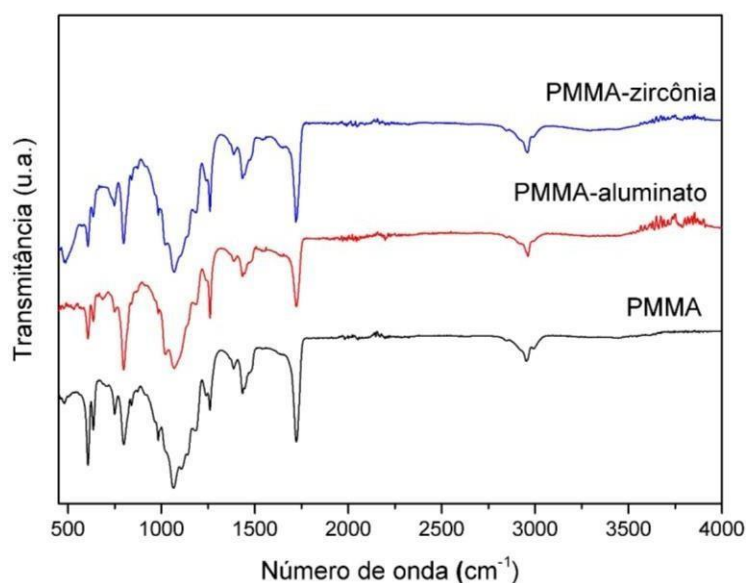
Legenda: Wt%- Porcentagem de massa; C- Carbono, O-Oxigênio; S – Enxofre, Ba- Bário; Ca- Cálcio; Al- Aluminato e Z- Zircônia.

Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.1.3 Espectroscopia de infravermelho por transformação de *Fourier* (FT-IR)

Na Figura 11 observam-se três espectros de FT-IR correspondentes aos grupos PMMA, PMMA+CAC e PMMA+Z. A composição das amostras apresentaram ligações químicas semelhantes, sem evidência dos elementos aditivos.

Figura 11- Representação de ligações encontradas na análise por espectroscopia de infravermelho por transformação de *Fourier* das partículas



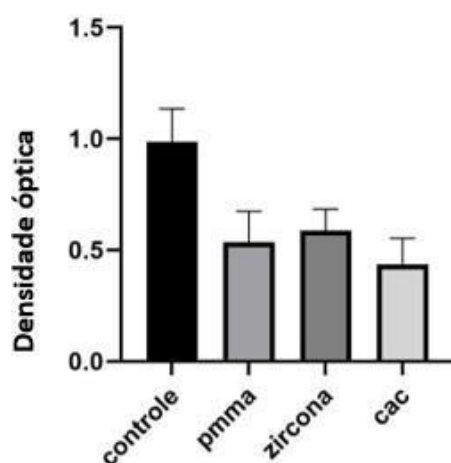
Fonte: Elaborado pela autora.

## 4.2 Ensaios biológicos in vitro

### 4.2.1 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Os dados da viabilidade celular foram submetidos à análise estatística (Figura 12) porém, não foi observada diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Figura 12 – Gráfico de média e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos no teste de MTT

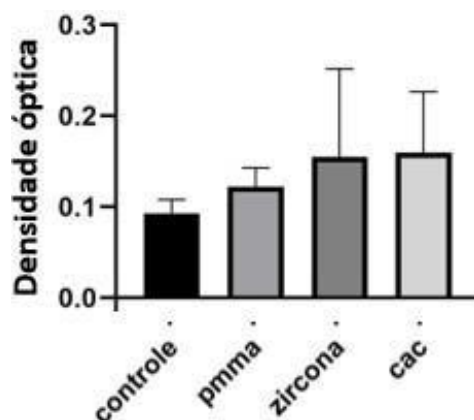


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.2.2 Conteúdo de Proteína Total

Os dados do conteúdo de proteína total foram submetidos a análise estatística (Figura 13) porém, não foi observada diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Figura 13 – Gráfico de média e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos no teste de proteína total

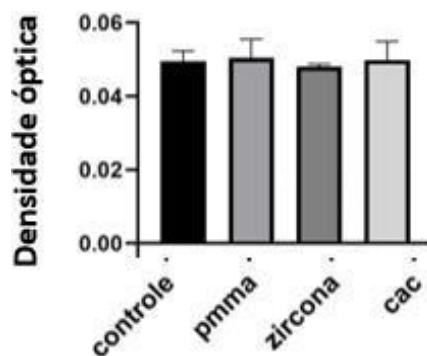


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.2.3 Atividade de fosfatase alcalina

Os dados da atividade de fosfatase alcalina foram submetidos a análise estatística (Figura 14) porém, não foi observada diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Figura 14 – Gráfico de média e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos no teste de ALP

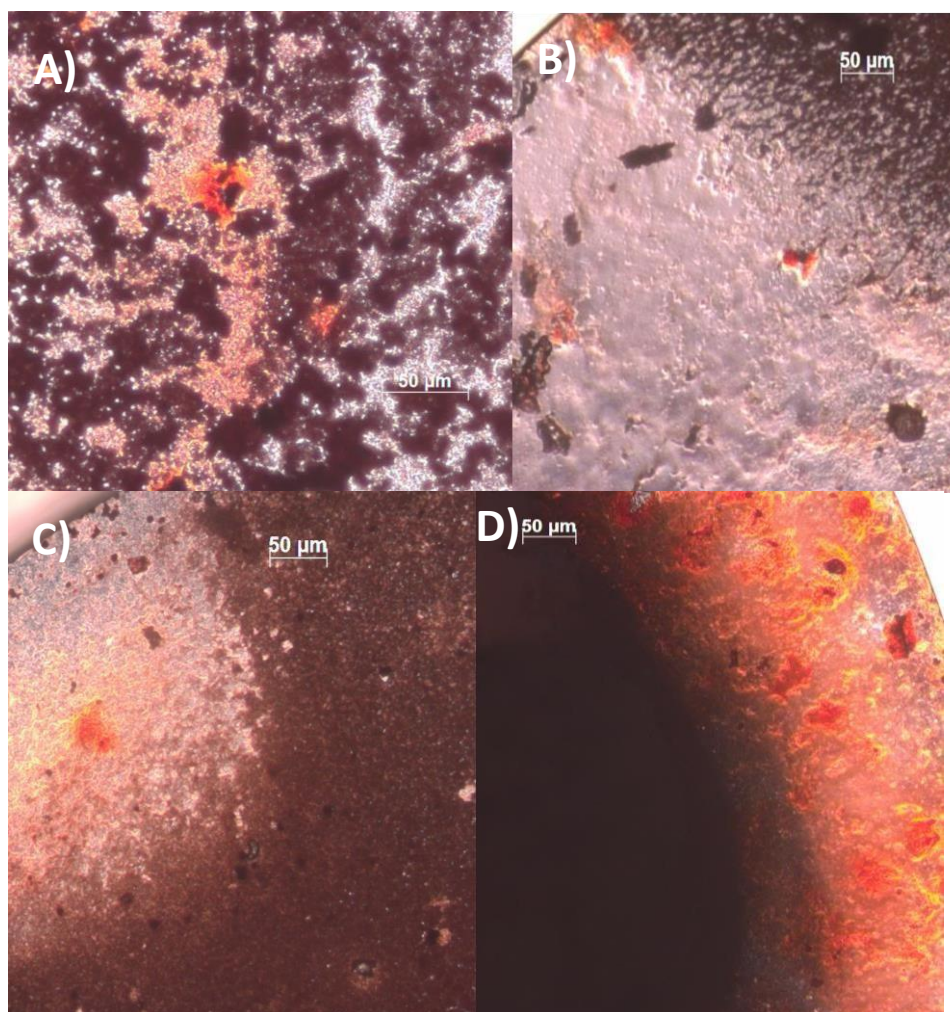


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.2.4 Análise de formação de nódulos de mineralização

Foram obtidas imagens de cada grupo para se observar a formação de nódulos de cálcio (Figura 15).

Figura 15- Análise de formação de nódulos de cálcio nas amostras



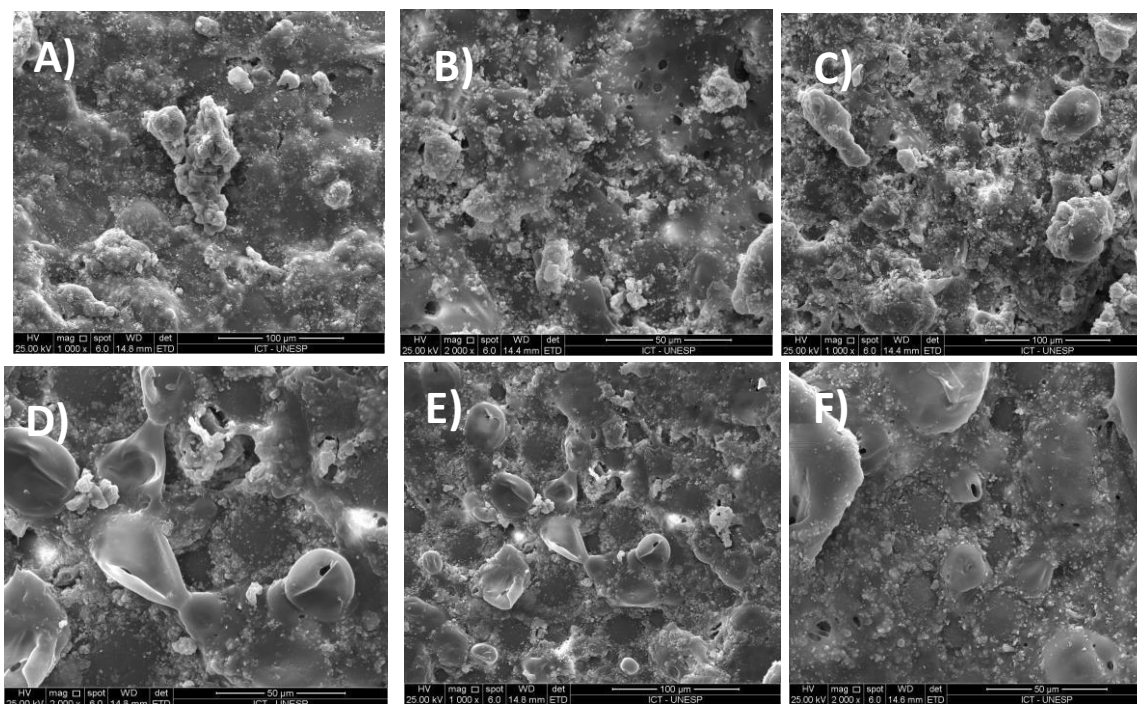
Legenda: a) poço do grupo controle em aumento no microscópio; b) poço do grupo PMMA em aumento no microscópio; poço do grupo PMMA+CAC em aumento no microscópio e d) poço do grupo PMMA+Z em aumento no microscópio.

Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.2.5 Análise da morfologia celular por MEV

Foram obtidas imagens (Figura 16) dos grupos com aumentos diferentes, nas figuras A, B e C amostras do grupo CAC, PMMA e zircônia respectivamente, em um aumento de 1000X, e nas Figuras D, E e F as mesmas amostras em um aumento de 2000X. Na superfície de todas as amostras foram observadas células, porém as imagens sugerem menos células no grupo PMMA do que nos grupos das blendas de PMMA com CAC e zircônia.

Figura 16 – Fotomiografia do MEV



Legenda: a) amostra do grupo PMMA+CAC em aumento de 1000X; b) amostra do grupo PMMA em aumento de 1000X; c) amostra do grupo PMMA+Z em aumento de 1000X; d) amostra do grupo PMMA+CAC em aumento de 2000X; e) amostra do grupo PMMA em aumento de 2000X; f) amostrado grupo PMMA+Z em aumento de 2000X.

Fonte: Elaborado pela autora.



#### 4.2.6 Teste de genotoxicidade

Foram contados os números de núcleos presentes em cada poço de cada amostra, assim como a presença de micronúcleos (Tabela 1). O grupo das amostras de PMMA com aluminato de cálcio apresentou o menor número de micronúcleos, e o grupo das amostras de PMMA com zircônia, o maior.

Tabela 1 - Contagem de núcleos e micronúcleos das amostras

| AMOSTRA                  | NÚCLEOS      | MICRONÚCLEOS |
|--------------------------|--------------|--------------|
| <b><i>CONTROLE -</i></b> | <b>2.948</b> | <b>45</b>    |
| <b><i>CONTROLE +</i></b> | <b>1.621</b> | <b>27</b>    |
| <b><i>PMMA</i></b>       | <b>3.140</b> | <b>47</b>    |
| <b><i>PMMA+CAC</i></b>   | <b>2.177</b> | <b>6</b>     |
| <b><i>PMMA+Z</i></b>     | <b>3.680</b> | <b>50</b>    |

Fonte: Elaborado pela autora.

## 5 DISCUSSÃO

O cimento ósseo foi originalmente desenvolvido em 1943 para uso no campo da odontologia. (Kühn, 2005). Atualmente, existem vários tipos diferentes de cimento ósseo e estes variam em suas propriedades biomecânicas. O primeiro cimento ósseo e ainda o mais utilizado é o cimento acrílico de polimetilmetacrilato (PMMA). Em 1958, Sir John Charnley usou pela primeira vez o cimento de PMMA em ortopedia em uma substituição total do quadril (O'Dowd-Booth et al., 2011).

Os cimentos ósseos são amplamente usados para a fixação de articulações artificiais. Eles preenchem o espaço livre entre a prótese e o osso e constituem uma zona muito importante de interface entre a prótese e o tecido vivo. Devido à sua rigidez, os cimentos podem amortecer uniformemente as forças que atuam contra o osso. A estreita ligação entre o cimento e o osso, bem como o cimento e a prótese, conduz a uma distribuição das tensões e da energia de deformação da interface (Kühn, 2005). O cimento também é usado para aumentar a estabilidade e melhorar a fixação (Al-Rashid et al., 2011).

O cimento ósseo tem sido cada vez mais utilizado em cirurgia ortopédica nos últimos 50 anos. Desde que Sir John Charnley foi pioneiro no uso de cimento de polimetilmetacrilato (PMMA) em substituições totais de quadril, foram desenvolvidas diferentes técnicas de cimentação e houve uma expansão no número de procedimentos ortopédicos que usam cimentos (O'Dowd-Booth et al., 2011).

O cimento de PMMA exibe um valor de elasticidade entre o implante e o osso, permitindo uma absorção de choque adicional e uma distribuição mais uniforme das forças de contato entre os dois materiais (O'Dowd-Booth et al., 2011).

Apesar do desenvolvimento e popularidade de novos biomateriais, o PMMA continua sendo amplamente utilizado (Liu et al., 2019; Schmidt-Malan et al., 2019; Yang et al., 2015), devido a sua aplicabilidade em vários procedimentos diferentes. Contudo, embora seus componentes básicos permaneçam os mesmos, pequenas mudanças criam variações em suas propriedades (Jaebon, 2010).

Os cimentos ósseos à base de PMMA são amplamente usados no tratamento de doenças, como na osteoporose que é uma situação em que há diminuição da qualidade óssea, mas também são usados para fixar implantes metálicos e restaurar espinhas, ossos e articulações fraturadas. (Hamajima et al., 2020; Saleh et al., 2016). No entanto, alguns efeitos colaterais como toxicidade de monômeros, exotermicidade, não degradação *in vivo* e excesso de resistência mecânica aparecem gradualmente durante as aplicações clínicas, o que limita o PMMA como cimento ósseo (Hamajima et al., 2020; Tsukimura et al., 2009; Xia et al., 2020).

Os biomateriais são baseados em uma ampla gama de materiais, como polímeros orgânicos, metais e cerâmicas, incluindo cerâmicas sinterizadas e quimicamente ligadas (silicatos, aluminatos, sulfatos e fosfatos). Os biomateriais geralmente são produzidos previamente ao uso no corpo utilizando uma preparação convencional do material. Entretanto, a necessidade de materiais de implante formados *in situ in vivo* torna as cerâmicas quimicamente ligadas potenciais biomateriais para o uso clínico. Essas cerâmicas incluem biomateriais produzidos à temperatura ambiente/corporal e com excelente biocompatibilidade, tais como o aluminato de cálcio (CAC) que vem sendo utilizado há mais de duas décadas devido às suas propriedades físicas, mecânicas gerais (Hermansson, 2011).

Comparado com fosfatos de cálcio e sulfatos de cálcio, o aluminato de cálcio mostra muitas semelhanças entre eles (não possuem cheiro e têm procedimentos de mistura semelhantes entre si). Os materiais à base de aluminato de cálcio apresentam, devido às suas características únicas de cura/endurecimento e microestrutura relacionada, um grande potencial dentro do campo de biomateriais (Hermansson, 2011).

Dentro da ortopedia Hermansson (2011) listou algumas áreas para a aplicação de materiais à base de aluminato de Ca; como a vertebroplastia, trauma e aumentos ósseos no geral. Dentre os benefícios dos biomateriais cerâmicos injetáveis à base de CAC relacionados a aplicações ortopédicas, Hermansson (2011) também listou a alta radiopacidade, alta viscosidade, resistência mecânica, biocompatibilidade e estabilidade a longo prazo.

Um estudo realizado por Engqvist et al. (2007) mostraram que o CAC apresenta resistência à compressão semelhante ao PMMA, característica que torna aluminato de cálcio promissor para seu uso junto ao PMMA. No teste biológico de ALP realizado não foi constatada diferença significativa, já em Messias et al. (2020), o teste ALP mostrou que a expressão do gene ALP no aluminato de cálcio foi maior.

Outra cerâmica utilizada no campo médico-odontológico é a zircônia, um material quimicamente inerte com baixa toxicidade e que devido à sua alta dureza à flexão, resistência à fratura, módulo de elasticidade e resistência ao desgaste, no final dos anos 80 passou a ser utilizada na medicina para a fabricação de próteses ortopédicas da cabeça do fêmur. As zircônias são as mais resistentes das cerâmicas odontológicas, são cada vez mais fabricadas para várias aplicações clínicas. (Chevalier, 2006; Özcan et al., 2016; Zhang, Lawn, 2018) sendo considerada um material estrutural pois quando submetida a tensões, melhora o desempenho mecânico (Hermansson, 2011; Özcan et al.,

2016) e apresenta as melhores propriedades mecânicas das cerâmicas de óxido (Chevalier, 2006; Zhang, Lawn, 2018).

Neste estudo, foi testada a incorporação de aluminato de cálcio e zircônia ao PMMA, visando melhorar sua *performance* como um cimento ósseo a partir da redução dos efeitos colaterais como toxicidade. Os resultados obtidos mostraram que houve pouca diferença estatística entre os grupos nos testes *in vitro* de citotoxicidade, genotoxicidade, proteína total e fosfatase alcalina, no teste de genotoxicidade e contagem de micronúcleos, as amostras de PMMA+Z foram as que apresentaram maior número de micronúcleos contados, sugerindo uma maior toxicidade dessa blenda.

## **6 CONCLUSÃO**

Neste estudo concluiu que as blendas do PMMA com os aditivos (aluminato de cálcio e zircônia), são promissoras devido a ausência de toxicidadee por permitirem a diferenciação celular, porém, não apresentaram diferença estatística com o cimento de PMMA o qual é utilizado clinicamente.

## REFERÊNCIAS

Al-Rashid M, Khan W, Kishan V. Principles of fracture fixation in Orthopaedic Trauma Surgery and recent advances. *Adv Med Biol.* 2011;27(3):249–60.

Alves HLR, Santos LA dos, Bergmann CP. Influência de aditivos na injetabilidade de cimento ósseo de fosfato tricálcico. *Matéria (Rio Janeiro).* 2006;11(3):324–31. doi: 10.1590/s1517-70762006000300022.

Burger CP, Moraes PC, Maniscalco CL, Borges PA, Batista PACS, Canola JC, et al. Cimento de aluminato de cálcio: uso em defeitos ósseos induzidos em fêmur de coelhos. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec.* 2013;65(3):757–62. doi:10.1590/s0102-09352013000300022.

Chevalier J. What future for zirconia as a biomaterial? *Biomaterials.* 2006;27(4):535–43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.034. PMID: 16143387.

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. PMID: 17659331.

Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis P V. Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011;9(1):66. doi: 10.1186/1741-7015-9-66. PMID: 21627784.

Dion I, Rouais F, Baquey C, Lahaye M, Salmon R, Trut L, et al. Physico-chemistry and cytotoxicity of ceramics. Part I. Characterization of ceramic powders. *J Mater Sci Mater Med.* 1997;8(5):325–32. doi: 10.1023/A:1018520630500.

Engqvist H, Peterson T, Loof J, Hermansson L. Chemical stability of anovelinjectable bioceramic for stabilisation of vertebral compression fractures *Trends Biomater Artifical Organs.* 2008;21(2):98

Hamajima K, Ozawa R, Saruta J, Saita M, Kitajima H, Taleghani SR, et al. The effect of TBB, as an initiator, on the biological compatibility of PMMA/MMA bone cement. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11). doi: 10.3390/ijms21114016. PMID: 32512780.

Hermansson L. Nanostructural chemically bonded ca-aluminate based

bioceramics. In: Pignatello R, editor. *Biomaterials - Physics and Chemistry* [Internet]. London: IntechOpen; 2011. [cited 2022 Oct 31]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/22916> doi: 10.5772/24411

Jaeblo T. Polymethylmethacrylate: properties and contemporary uses in orthopaedics. *J Am Acad Orthop Surg*. 2010 May;18(5):297-305. doi: 10.5435/00124635-201005000-00006. PMID: 20435.

Kühn KD. What is bone cement? Well-Cemented Total Hip Arthroplast Theory Pract. 2005;52–9. doi: 10.1007/3-540-28924-0\_5.

Liu X, Cheng C, Peng X, Xiao H, Guo C, Wang X, et al. A promising material for bone repair: PMMA bone cement modified by dopamine-coated strontium-doped calcium polyphosphate particles. *R Soc Open Sci*. 2019;6(10). doi: 10.1098/rsos.191028.

Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res*. 1988;254(2):317–30.

Messias NS, Grisote G, Martorano AS, Fernandes RR, de Oliveira IR, Bombonato-Prado KF, et al. Impact of calcium aluminate cement with additives on dental pulp-derived cells. *J Appl Oral Sci*. 2020;28:1–8. doi: 10.1590/1678-7757-2019-0105. PMID: 31800873.

O'Dowd-Booth CJ, White J, Smitham P, Khan W, Marsh DR. Bone cement: perioperative issues, orthopaedic applications and future developments. *J Perioper Pract*. 2011;21(9):304–8. doi: 10.1177/175045891102100902. PMID: 22474774.

Özcan M, Volpato CÂM, Fredel MC. Artificial aging of zirconium dioxide: an evaluation of current knowledge and clinical relevance. *Current Oral Health Reports*. 2016;3:193–7. doi: 10.1007/s40496-016-0096-9

Saleh KJ, El Othmani MM, Tzeng TH, Mihalko WM, Chambers MC, Grupp TM. Acrylic bone cement in total joint arthroplasty: A review. *J Orthop Res*. 2016;34(5):737–44. doi: 10.1002/jor.23184. PMID: 26852143.

Schmidt-Malan SM, Greenwood-Quaintance KE, Berglund LJ, Mandrekar J, Patel R. Oritavancin polymethylmethacrylate (PMMA) - Compressive strength testing and in vitro elution. *J Orthop Surg Res*. 2019;14(1):1–7. doi:



10.1186/s13018-019-1080-6. PMID: 30755223.

Sugita Y, Okubo T, Saita M, Ishijima M, Torii Y, Tanaka M, et al. Novel osteogenic behaviors around hydrophilic and radical-free 4-META/MMA-TBB: Implications of an osseointegrating bone cement. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):1–24. doi: 10.3390/ijms21072405. PMID: 32244335.

Thrivikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dent Clin North Am*. 2017 Oct;61(4):835-856. doi: 10.1016/j.cden.2017.06.003. PMID: 28886771; PMCID: PMC5663293

Tsukimura N, Yamada M, Aita H, Hori N, Yoshino F, Chang-Il Lee M, et al. N-acetyl cysteine (NAC)-mediated detoxification and functionalization of poly(methyl methacrylate) bone cement. *Biomaterials*. 2009;30(20):3378–89. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.043. PMID: 19303139.

Xia X, Shi R, Huang J, Li Y, Zuo Y, Li J. Development of a phase change microcapsule to reduce the setting temperature of PMMA bone cement. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2020;18(24):0–5. doi: 10.1177/2280800020940279. PMID: 33147094.

Yang J, Zhang K, Zhang S, Fan J, Guo X, Dong W, et al. Preparation of calcium phosphate cement and polymethyl methacrylate for biological composite bone cements. *Med Sci Monit*. 2015;21:1162–72. doi: 10.12659/MSM.893845. PMID: 25904398.

Zhang Y, Lawn BR. Novel zirconia materials in dentistry. *J Dent Res*. 2018;97(2):140–7. doi: 10.1177/0022034517737483. PMID: 29035694.