



RENORBIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**BIOMATERIAL A BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO, DOPADO COM CÉRIO
OU GÁLIO PARA PREENCHIMENTO ÓSSEO**

MARCOS PEREIRA DA SILVA

TERESINA-PI

2018

MARCOS PEREIRA DA SILVA

**BIOMATERIAL A BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO, DOPADO COM CÉRIO
OU GÁLIO PARA PREENCHIMENTO ÓSSEO**

Trabalho submetido ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Piauí, Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Vasconcelos Fialho

TERESINA-PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

S586b Silva, Marcos Pereira da.
Biomaterial a base de fosfato de cálcio, dopado com cério
ou gálio para preenchimento ósseo / Marcos Pereira da Silva. –
2018.
116 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal
do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia, Teresina, 2018.
“Orientador: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho”.
“Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Vasconcelos
Fialho”.

1. Hidroxiapatita. 2. Metais. 3. Atividade Antibacteriana.
4. Citotoxicidade. 5. Engenharia de Tecidos. I. Título.

CDD 620.112



renorbio
rede nordeste de biotecnologia

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: MARCOS PEREIRA DA SILVA

TÍTULO DO PROJETO: "BIOMATERIAL À BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO, DOPADO COM CÉRIO E GÁLIO PARA PREENCHIMENTO ÓSSEO."

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Ana Cristina Vasconcelos Fialho - UFPI (Coorientadora)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho – UFPE (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	
Profª. Dra. Marcília Pinheiro da Costa - UFPI (Examinadora)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho - UESPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 17 de dezembro de 2018.

HORÁRIO: 8h30

LOCAL: Auditório do PPGCM/UFPI

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, especialmente a meus pais José Pereira e Maria Campelo pelo amor e carinho, enfim, por tudo. A minha esposa Janaria pelo companheirismo, amor e carinho e a nossa filha Melyna, presente que Jesus Cristo nos deu. Aos meus irmãos Ana Márcia, Livramento, Ismêndia, Admara, Valdemir, Vanderlei, Zé Filho, Emídio, e o Neto (“in memoriam”) pelo apoio, amizade, carinho. A todos meus sobrinhos pela amizade e carinho. As minhas avós e aos meus avôs tanto paternos como maternos. Aos meus professores pela confiança e orientação. Assim, todas as graças que tive são construídas através desses relacionamentos saudáveis permitidas por Deus. Obrigado a todos por tudo.

- Inicialmente a Deus que orienta o mundo em todos os aspectos, inclusive minha existência, e todos os meios para dar continuidade à vida.
- Aos **meus pais, José Pereira da Silva e Maria Campelo da Silva**, por carinho, palavras, amor, amizade, e, enfim, por tudo.
- A minha esposa **Janaria Pereira de Araujo** pelo amor e carinho e a nossa princesa **Melyna** papai ama muito.
- Aos **meus irmãos**, Ana Márcia, Livramento, Ismêndia, Admara, Valdemir, Vanderlei, Zé Filho, Emídio, e o Neto (“*in memorian*”); pela nossa amizade, carinho, amor, companheirismo, palavras de conforto. Sou muito feliz pela existência de meus irmãos na construção da minha vida.
- Aos **meus sobrinhos** Daniel, Liedson, Romário, Andson, Lenilson (“*in memorian*”), Allan, Vinicius, Sebastião Neto, as minhas sobrinhas Elaísa, Rayla, Carol, Laiane, Leidiane, Lizandra, Laiza, Nayra, pelas amizades, carinhos, companheirismo e por tudo, sou muito grato por existir os meus queridinhos.
- Aos **meus tios** Manoel, Raimundo, Osmar, João, Dezin, Santidio, pelo apoio, amizade dentre outras colaborações.
- Aos **meus cunhados** Neto e Edgar, pela amizade, apoio e companheirismo.
- Aos **meus avôs** Emídio Absolon e João Campelo, “*in memorian*” pelo carinho, amor e apoio.
- As **minhas avós**, Conceição (“*in memorian*”) e Ana Zila, pelo carinho, amor, companheirismo, ensinamentos para construção da minha subjetividade.
- Ao meu **sogro** José e minha **sogra** Alice pelo apoio e carinho.
- Aos meus amigos de infância, **Luís Alberto, Luiza, Analine, Darlon Brandão e Rafael Pereira** pelas nossas amizades, apoio e companheirismo.
- Ao meu amigo **Paulo César Bandeira**, pela nossa amizade, apoio e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

- Ao **meu orientador, Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho**, que aceitou o pedido de orientação e depositou confiança em mim para realização deste trabalho, por suas orientações no desenvolvimento do mesmo e pelo apoio em tudo.
- Ao professor **Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Fialho Vasconcelos** pelo grande apoio, orientação sobre o tema, parceria, muito relevante para concretização deste trabalho.
- Ao professor **Prof. Dr. Milton Matos** pela nossa amizade, troca de conhecimento e por todo o apoio e sugestões.
- Ao meu amigo **Jardel Meneses** que o considero como um irmão e que amo bastante, pela nossa amizade, apoio e por toda ajuda. Sou feliz por ter conhecido essa pessoa.
- A **CAPES** pela Bolsa cedida para facilitar o desenvolvimento do trabalho.
- A Universidade Federal do Piauí pelo espaço físico e matéria prima para o desenvolvimento do trabalho.
- Ao **Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV)**, pelo espaço cedido no desenvolvimento das atividades inerentes a este trabalho.
- Ao **Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho**, pelo enorme apoio para desenvolvimento do trabalho e ao laboratório da Universidade Estadual do Piauí e **seus colaboradores, Daniel, Larissa, Karol, Cabral** e os demais.
- A **Prof. Dr^a Karla Rovaris**, pelo apoio e colaboração o desenvolvimento do trabalho.
- Ao **meu amigo Doutorando Ewerton Vieira** pelas colaborações e apoio no desenvolvimento do trabalho.
- Aos amigos do LIMAV e adjacentes, **Thales, Roosevelt Delano, Edgar, Kelson, Kilson e Ricardo**, por todo o apoio para construção deste trabalho.
- A todos os professores do Programa de Pós-Graduação Renorbio-UFPI.
- E a todos os demais parceiros que conheço pelas inúmeras contribuições e apoio.

“Tu criaste o íntimo do meu ser e me teceste no ventre de minha mãe. Eu te louvo porque me fizeste de modo especial e admirável. Tuas obras são maravilhosas! Disso tenho plena certeza. Meus ossos não estavam escondidos de ti quando em secreto fui formado e entretecido como nas profundezas da terra. Os teus olhos viram o meu embrião; todos os dias determinados para mim foram escritos no teu livro antes de qualquer deles”

Salmos 139:13-16

Já dizia o Raul Seixas “tenha fé em Deus tenha, fé na vida tente outra vez” Sempre acredito em Deus e nunca desistir dos meus objetivos sempre direcionado com respeito ao próximo.

Resumo

Vários são os materiais utilizados para os defeitos ósseos, a hidroxiapatita (HAp) por ser um material com propriedades similares ao tecido ósseo tem destaque, porém, tal aplicação pode ser ainda melhorada com a incorporação de íons metálicos. Assim, o presente estudo teve como escopo a síntese da hidroxiapatita e dopada com metais em diferentes proporções pelo método de precipitação. A eficácia da síntese foi verificada por Difração de raios X (DRX), Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), análise térmica (TG), Microscopia eletrônica de varredura acoplado a energia dispersiva (MEV-EDS) e Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A avaliação da atividade bacteriana foi realizada pelo teste de contato direto, revelando efeitos favoráveis na inibição bacteriana para a hidroxiapatita incorporada com cério ou gálio quando comparada com a HAp. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólico] e todos os materiais apresentaram viabilidade celular. No teste *in vivo* nas ratas os materiais com cério ou gálio apresentaram pela Microtomografia computadorizada (Micro-CT) resultados estatisticamente superiores na neoformação óssea quando comparado com os animais que não receberam os materiais. Portanto, tais resultados obtidos, permitem inferir que as sínteses dos materiais ocorreram com sucesso e que os materiais dopados pelos íons metálicos podem ser promissores na engenharia de tecido ósseo.

Palavras-Chave: Hidroxiapatita, metais, atividade antibacteriana, citotoxicidade, engenharia de tecidos.

Abstract

Several are the materials used for bone defects, because hydroxyapatite (HAp) is a material with properties similar to bone tissue, but such application can be further improved with the incorporation of metal ions. Thus, the present study had as its scope the synthesis of hydroxyapatite and doped with metals in different proportions by the precipitation method. The efficiency of the synthesis was verified by X-ray diffraction (XRD), X-ray excited photoelectron spectroscopy (XPS), thermal analysis (TG), dispersive energy coupled scanning electron microscopy (SEM) and infrared spectroscopy Fourier transform (FTIR). The evaluation of the bacterial activity was performed by the direct contact test, revealing favorable effects on bacterial inhibition for the hydroxyapatite incorporated with cerium or gallium when compared to the HAp. Cytotoxicity was evaluated by the colorimetric assay of [3- (4,5-dimethylthiazole) -2,5-diphenyltetrazolic bromide] and all materials showed cell viability. In the in vivo test in the rats the materials with cerium or gallium showed by computerized Microtomography (Micro-CT) statistically superior results in the new bone formation when compared with the animals that did not receive the materials. Therefore, these results allow to infer that the syntheses of the materials have occurred successfully and that the materials doped by the metallic ions can be promising in the engineering of bone tissue.

Keywords: Hydroxyapatite, metals, antibacterial activity, cytotoxicity, tissue engineering

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Hidroxiapatita aplicada à regeneração óssea em fraturas causadas por osteoporose: uma revisão

Figura 1- Representação da quantidade de artigos encontrados sobre a delimitação do tema.....30

Figura 2- Imagens 3-D de micro-CT do fêmur após 12 semanas dos implantes dos grupos HA, HA-Zn, HA-Mg e HA-Sr.....35

Capítulo 2: Hidroxiapatita dopada com cério: Síntese, caracterização, atividade antibacteriana e citocompatibilidade in vitro

Figura 1- DRX de hidroxiapatita e HAp dopadas com Ce^{3+} sintetizado pelo método de precipitação.....51

Figura 2- Gráfico de refinamento pelo método Rietveld da HAp dopado com Ce^{3+} sintetizado pelo método de precipitação.....52

Figura 3- FTIR da (a) HAp, (b) HAp-Ce-1.75, (c) HAp-Ce-2.5 e (d) HApCe-5,00.....54

Figura 4- MEV-EDS imagens da (a) HAp, (b) HAp-Ce-1.75, (c) HAp-Ce-2.5 e (d) HAp-Ce-5,00.....55

Figura 5- TG da HAp, HAp-Ce-1.75, HAp-Ce-2.5 e HAp-Ce-5,00.....57

Figura 6- Espectro do XPS para a amostra HApCe-5,00.....58

Figura 7- Efeito inibidor de HAp dopada com cério 1,75, 2,50 e 5,00% em linhagens padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922).....59

Figura 8- Imagens das placas sobre o efeito inibitório de HAp dopada com cério 1,75, 2,50 e 5,00% em linhagens padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922).....59

Figura 9- Ensaio de citocompatibilidade in vitro de HAp, Ce-2.50: HAp e Ce 5.00: HAp realizado com linhagem de células de fibroblastos humanos (GM07492). Os resultados são expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle negativo (DMEM + 10% FBS). Grupo controle positivo como referência de efeito citotóxico (DMEM + 10% FBS + 30% DMSO). Análise estatística: ANOVA ONE WAY e o teste post hoc da FISHER. * $p \leq 0,05$63

Capítulo 3: Estudos das propriedades biológicas da hidroxiapatita dopada com Ga³⁺ para aplicações em reparação tecidual óssea

Figura 1- Padrão de difração de Raios-X das amostras HAp, HAp-Ga-2,5%, HAp-Ga-5,0%.....	77
Figura 2- Figura 4- Gráfico de refinamento pelo método Rietveld da hidroxiapatita incorporada com gálio 5,0%.....	78
Figura 3 - Espectros FTIR dos materiais HAp, HAp-Ga-2,5% e HAp-Ga-5,00%.....	79
Figura 4 - Espectroscopia Raman da HAp, HAp-Ga-2,5% e HAp-Ga-5,0%.....	80
Figura 5 - TG da HAp, HAp-Ga-2,5% e HAp-Ga-5,0%.....	81
Figura 6- Imagens obtidas através do MEV das amostras HAp, HAp-Ga-2,5%, HAp-Ga-5,0% e os resultados do EDS das amostras (a) HAp, (b) HAp-Ga-2,5% e (c) HAp-Ga-5,0%.....	83
Figura 7- Gráfico do efeito inibitório das amostras HAp, HAp-Ga-2,5%, HAp-Ga-5,0% sobre a cepa padrão <i>E. coli</i> (ATCC 25922).....	84
Figura 8 – Imagens das placas mostrando o efeito inibitório das amostras HAp, HAp-Ga-2,5%, HAp-Ga-5,0% sobre cepas padrão de <i>S. aureus</i> (ATCC 25923).....	85
Figura 9 - Imagens das placas mostrando o efeito inibitório das amostras HAp, HAp-Ga-2,5%, HAp-Ga-5,0% sobre a cepa padrão <i>E. coli</i> (ATCC 25922).....	85
Figura 10– Citotoxicidade em células fibroblasto GM07492 expostas aos materiais sintetizados.....	87

Capítulo 4: Efeito da hidroxiapatita incorporada com íons gálio (Ga³⁺) ou cério (Ce³⁺) na reparação óssea em ratas com osteoporose induzida por ovariectomia

Figura 1- Dosagem da concentração de cálcio para as ratas wistar.....	98
Figura 2- Espectro do Raman 15 dias para os grupos controle positivo (OSSO), OVXCE15, OVXGA15, SHAM15 e OVXCOAG15.....	99
Figura 3- Espectro do Raman 30 dias para os grupos controle positivo (OSSO), OVXCE30, OVXGA30, SHAM30 e OVXCOAG30.....	100
Figura 4- Análise estatística obtida pelo Raman 15 dias para os grupos controle positivo (OSSO), OVXCE15, OVXGA15, SHAM15 e OVXCOAG15.....	101

Figura 5- Análise estatística obtida pelo Raman 30 dias para os grupos controle positivo (OSSO), OVXCE30, OVXGA30, SHAM30 e OVXCOAG30.....	101
Figura 6- Em todos os grupos a neoformação óssea trabecular (*) foi de aspecto imaturo, com número variável de osteoblastos e osteócitos (setas). A: Grupo CS. B. Grupo CC. C. Grupo OVX-Hap-Ga. D. Grupo OVX-Hap-Ce. H.E., 10x	103
Figura 7- Em todos os grupos a neoformação óssea compacta (*) e de aspecto primário ou lamelar, menos acentuada no grupo CC. A: Grupo CS. Presença de numerosos ósteons com centro basofílico. B. Grupo CC. C. Grupo OVX-HAp-Ga. D. Grupo OVX-HAp-Ce. H.E., 10x	104
Figura 8- Micro-CT com imagens representativas da neoformação óssea, aos 15 dias do pós-operatório dos grupos CC, OVX-HAp-Ga e OVX-HAp-Ce e CS. Reconstruções axiais.....	105
Figura 9- A análise estatísticas do volume de tecido ósseo neoformado (BV/TV).....	106
Figura 10. Micro-CT com imagens representativas da neoformação óssea, aos 30 dias do do pós-operatório dos grupos CC, OVX-HAp-Ga, OVX-HAp-Ce e CS. Reconstruções axiais.....	107
Figura 11- A análise estatísticas do volume de tecido ósseo neoformado após 30 dias dos implantes (BV/TV).....	107

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Hidroxiapatita aplicada à regeneração óssea em fraturas causadas por osteoporose: uma revisão

Tabela 1 - Quantidade de publicações encontradas no banco de dados Scopus.....	28
Tabela 2 - Quantidade de publicações encontradas no banco de dados Web of Science.....	28
Tabela 3 - Quantidade de publicações encontradas no banco de dados Scielo.....	29
Tabela 4 - Relação dos materiais sintetizados nos artigos e suas aplicações.....	32
Tabela 5 - Quantidade de patentes encontradas nos bancos de patentes EPO, USPTO e INPI.....	36
Tabela 6 - Características das patentes encontradas no EPO.....	37

Capítulo 2: Hidroxiapatita dopada com cério: Síntese, caracterização, atividade antibacteriana e citocompatibilidade in vitro

Tabela 1- Tamanho médios de cristalitos sintetizados.....	53
Tabela 2- Percentagem atômica semi-quantitativa de HAp e HAp dopada com Ce obtida por EDS.....	56

Capítulo 3: Estudos das propriedades biológicas da hidroxiapatita dopada com Ga³⁺ para aplicações em reparação tecidual óssea

Tabela 1 - Percentagem atômica semi-quantitativa de HAp e HAp contendo com Ga obtida por EDS.....	84
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

η = Efeito inibitório

ATCC = *American Type Culture Collection*

BHI = *Brain heart infusion*

BV - Volume ósseo

BV/TV- Porcentagem de volume ósseo

CMI = Concentração mínima inibitória

DRX = Difração de raios X

EPO = *European Patent Office*

EDS = Espectroscopia de energia dispersiva de Raios X

FTIR = Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier

FWHM = *Full width half maximum*

HAp = Hidroxiapatita

HAp-Ce-1,75% = Hidroxiapatita dopada com 1,75 % de cério

HAp-Ce-2,50% = Hidroxiapatita dopada com 2,50 % de cério

HAp-Ce-5,00% = Hidroxiapatita dopada com 5,00 % de cério

HAp-Ga-2,50% = Hidroxiapatita dopada com 2,50 % de gálio

HAp-Ga-5,00% = Hidroxiapatita dopada com 5,00 % de gálio

INPI = Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

JCPDS-ICCD = Joint Committee on Powder Diffraction Standards – International Center of Diffraction Data

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

MH = Mueller-Hinton

Micro-CT= Microtomografia Computadorizada

N1 = Média aritmética das unidades formadoras de colônia das placas de controle

N2 = Média aritmética das unidades formadoras de colônias de cada material testado.

OVX+CÉRIO = ratas ovariectomizadas e defeitos preenchidos com hidroxiapatita dopada - cério 5%.

OVX+COÁGULO = ratas ovariectomizadas e defeitos sem preenchimentos de materiais

OVX+GÁLIO = ratas ovariectomizadas e com defeitos preenchidos com hidroxiapatita dopada com gálio 5%

SHAM = ratas não ovariectomizadas e defeitos sem preenchimentos de materiais

TG = Termogravimetria

TV-Volume da amostra

UFC = Unidade Formadora de Colônia

USPTO = *United States Patent and Trademark Office*

XPS= Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	21
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 1: ARTIGO DE REVISÃO	23
Resumo	24
Abstract	25
1. Introdução	26
2. Metodologia	27
3. Resultados e Discussão	27
3.1 Pesquisa de artigos nas bases de dados <i>Scopus</i> , <i>Web of Science</i> e <i>Scielo</i>	27
3.2 Busca nos principais bancos de patentes.....	35
4. Conclusão	38
5. Referências	38
CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO	42
Resumo	43
Abstract	44
1. Introdução	45
2. Parte Experimental	46
2.1 Materiais.....	46
2.2 Síntese da HAp	46
2.3 Síntese da HAp dopada com Ce.....	47
2.4 Caracterizações dos materiais.....	47
2.4.1 Difratomia de Raios X (DRX).....	47

2.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier.....	47
2.4.3 Análise térmica.....	48
2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	48
2.4.5 A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).....	48
2.5 Atividade antibacteriana por contato direto.....	48
2.6 Citocompatibilidade (MTT).....	49
3. Resultados e Discussão.....	50
3.1 Caracterização dos materiais.....	50
3.1.1 Difractometria de Raios X (DRX).....	50
3.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier.....	53
3.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	54
3.1.4 Análise térmica.....	56
3.1.5 A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)	58
3.2 Atividade antibacteriana por contato direto.....	58
3.3 Citocompatibilidade (MTT).....	61
4. Conclusão.....	63
5. Referências	64
CAPÍTULO 3: ARTIGO CIENTÍFICO.....	67
Resumo.....	68
Abstract.....	69
1. Introdução.....	70
2. Parte experimental.....	71
2.1 Materiais e Reagentes.....	71

2.2 Síntese da hidroxiapatita.....	71
2.3 Síntese da Hidroxiapatita dopada com Ga ³⁺	72
2.4 Caracterizações.....	72
2.4.1 Difractometria de Raios X (DRX).....	72
2.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier.....	73
2.4.3. Raman.....	73
2.4.4 Análise térmica.....	74
2.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	74
2.5 Teste antibacteriano.....	74
2.5.1 Cepas Bacterianas.....	74
2.5.2 Preparo do Inóculo.....	74
2.5.3 Teste Contato direto.....	75
3.5.4 Teste de Viabilidade celular (citotoxicidade).....	75
3. Resultados e Discussão.....	76
3.1 Caracterização da Hidroxiapatita e da Hidroxiapatita dopada com gálio.....	76
3.1.1 Difractometria de Raios X.....	76
3.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	79
3.1.3 Raman.....	80
3.1.4 Análise térmica.....	81
3.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	82
3.2 Ensaio biológicos.....	84
3.2.1 Teste antibacteriano.....	84
3.2.2 Teste de citotoxicidade.....	86
4. Conclusão.....	87
5. Referências.....	88

CAPÍTULO 4: ARTIGO CIENTÍFICO	91
Resumo	92
Abstract	93
1. Introdução	94
2. Parte experimental	94
2.1 Aspectos éticos.....	94
2.2 Animais.....	95
2.3 Biomateriais	95
2.4 Grupos Experimentais.....	95
2.5 Procedimento cirúrgico.....	95
2.6 Procedimento Tecidual.....	96
2.7 Dosagem de cálcio.....	96
2.8 Análises Estatísticas.....	97
2.9 Espectroscopia Raman Confocal.....	97
2.10 Análise Histológica.....	97
2.11 Análise por Microtomografia computadorizada.....	97
3. Resultados e Discussão	98
3.1 Dosagem de cálcio.....	98
3.2 Espectroscopia Raman do tecido ósseo.....	99
3.3 Análise Histológica.....	102
3.4 Análise por Microtomografia.....	104
4. Conclusão	108
5. Referências	108
Considerações finais	111
Anexos	112

APRESENTAÇÃO

Um problema de saúde que afeta a sociedade é a perda óssea, porém, já despertou o interesse dos pesquisadores em substituir por materiais sintéticos. Assim, a hidroxiapatita, apresenta-se como um material promissor para ser aplicado como substituinte devido sua compatibilidade e similaridade com o osso humano, mas, por si só apresenta limitações na inibição da proliferação microbiológica reduzindo o sucesso do material bem como a vida útil [1-2].

Nesse contexto, devido à limitação da hidroxiapatita frente a proliferação de microbiológica, faz-se necessário à procura de novos agentes que possam ser empregados para garantir o sucesso dos materiais nos implantes ortopédicos pós-operatórios. Uma das alternativas é o uso de antibióticos para amenizar a proliferação dos microrganismos, no entanto, a capacidade de resistência dos microrganismos, assim como, a alta dosagem por via oral ou injeção utilizada torna a proposta mitigada para resolver tal situação [3].

Outra alternativa para amenizar as infecções pós-operatória são as intervenções cirúrgicas, onde é removido a parte óssea infeccionada pela atuação dos microrganismos com a finalidade de não ocorrer a infecção crônica. No entanto, esse procedimento possibilita a iniciação de uma nova infecção pós-operatória levando assim a um resultado desfavorável [4].

Diante disso, a literatura expõe em trabalhos que modificações da hidroxiapatita com outros materiais seja pela incorporação de metais e/ou uso de biopolímeros naturais que possuam a potencialidade de inibir o crescimento de organismos patogênicos no biomaterial possa ser a via susceptível de resultado favorável nos implantes ósseos pós-operatórios possibilitando uma maior vida útil para o material e conseqüentemente sucesso nos implantes ortopédicos [5-9].

Assim, o presente trabalho foi dividido em 4 capítulos sendo que o Capítulo 1 apresenta uma revisão da literatura com a hidroxiapatita e sua aplicação em regeneração óssea em fraturas provocadas por osteoporose. No Capítulo 2 será apresentado um artigo científico, mostrando a síntese da hidroxiapatita dopada em diferentes concentrações de cério, obtida por meio de precipitação, caracterizada por DRX, FTIR, TG, MEV-EDS, XPS e avaliação da inibição de cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e teste de citotoxicidade. No Capítulo 3, o artigo científico descreve a síntese da hidroxiapatita incorporada com diferentes concentrações de gálio, obtida por meio de

coprecipitação, caracterizada por DRX, FTIR, TG, MEV-EDS, Raman e avaliação da inibição de cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e teste de citotoxicidade. No capítulo 4 é demonstrado um trabalho na qual foi avaliado o efeito na reparação óssea em defeitos de ratas com osteoporose induzida após o implante de hidroxiapatita incorporada com cério ou gálio.

Referências

- [1] D. Gopi, D.; A. Karthika, A.; S. Nithiya, S.; L. Kavitha, L. In vitro biological performance of minerals substituted hydroxyapatite coating by pulsed electrodeposition method, *Materials Chemistry Physics*. 2014, 144, 75–85.
- [2] Yajing, Y.; Xuejiao Z.; Yong, H.; Qiongqiong, D.; Xiaofeng, P. Antibacterial and bioactivity of silver substituted hydroxyapatite/TiO₂nanotube composite coatings on titanium Yajing. *Applied Surface Science*. 2014, 314, 348–357.
- [3] Levitt, GE. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1969,3, 683-685.
- [4] Mayo Foundation for Medical Education and Research, Osteomyelitis, acessado de <http://www.mayoclinic.com/print/osteomyelitis/DS00759/DSECTION=all&METHOD=print> .
- [5] Morais, DS.; Fernandes, S.; Gomes, PS.; Fernandes, MH.; Sampaio, P.; Ferraz, MP.; Santos, JD.; Lopes, MA.; Hussain, NS. Novel cerium doped glass-reinforced hydroxyapatite with antibacterial and osteoconductive properties for bone tissue regeneration *Biomedical Materials*. 10, 2015, 055008.
- [6] U. Anjaneyulu, U.; Swaroop, VK.; Vijayalakshmi, U. Preparation and characterization of novel Ag doped hydroxyapatite–Fe₃O₄–chitosan hybrid composites and in vitro biological evaluations for orthopaedic applications. *RSC Advances*., 2016, 6, 10997–11007.
- [7] Amrita, RSM.; Pijush, G. Nanomechanical characterization and molecular mechanism study of nanoparticle reinforced and cross-linked chitosan biopolymer. *Journal the mechanical behavior of medical materials*. 2016, 55, 42-62.
- [8] Arundhati, B.; Nilkamal, P.; Piyali, JM.; Tapas, M.; Thirupathi, KRS.; Arumugam, G.; Manas, D.; Patit, PK. Development of porous and antimicrobial CTS–PEG–HAP–ZnO nano-composites for bone tissue Engineering. *RSC Advances*. 2015, 5, 99385–99393.
- [9] Andrew, PH.; Arun, KK. Vivek, T.; Nichola, J. Coleman Bioactivity, biocompatibility and antimicrobial properties of a chitosan-mineral composite for periodontal tissue regeneration. *Polímeros*. 2015, 25(3), 311-316.

CAPÍTULO 1: Artigo de revisão

Hidroxiapatita aplicada à regeneração óssea em fraturas causadas por osteoporose: uma revisão

*Marcos Pereira da Silva^a, Ewerton Gomes Vieira^a, Ricardo Barbosa de Sousa^a, Ana
Cristina Vasconcelos Fialho^b, Edson Cavalcanti da Silva Filho^a*

*^aLaboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados, Universidade Federal do Piauí,
64049-550, Teresina-PI, Brasil*

*^bDepartamento de Patologia e Clínica Odontológica, Universidade Federal do Piauí,
64049-550, Teresina-PI, Brasil*

Resumo

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica e progressiva caracterizada pela fragilidade óssea devido à deterioração da microarquitetura do tecido ósseo e da redução da massa óssea. Ressalta-se que essa doença é uma condição mais comum nas mulheres (70%), no período pós-menopausa, em virtude do comprometimento da função ovariana associado a deficiência de hormônios. Diante disso, medidas para prevenção e tratamento da osteoporose são tomadas, para alívio dos sintomas e redução do risco de fraturas, dentre estas, suprimento de cálcio por meio de terapias farmacológicas. Entretanto, há poucas discussões acerca de abordagens relativas à regeneração óssea em condições de osteoporose. Portanto, o presente trabalho consiste em um levantamento de artigos e patentes, sem e com restrição de tempo (2008 a 2017), com objetivo de agrupar informações sobre a hidroxiapatita aplicada em reparo ósseo devido à osteoporose. Assim, os bancos de busca, de artigos foram *Scopus*, *Web of Science* e *Scielo* e, para patentes, *Espacenet*, *INPI* e *USPTO*. Sendo assim, os resultados obtidos, apresentam o uso da hidroxiapatita incorporada com metais e/ou fármacos empregados no tratamento da osteoporose para melhorar a osteogênese devido fraturas oriundas da osteoporose, porém, esses estudos são recentes necessitando de mais exploração, revelando a importância do estudo nesse campo.

Palavras-Chave: fosfato de cálcio, engenharia tecidual, osteogênese.

Abstract

Osteoporosis is a systemic and progressive skeletal disease characterized by bone fragility due to deterioration of the microarchitecture of bone tissue and reduction of bone mass. It is noteworthy that this disease has a more significant effect in women (70%) in the postmenopausal period, due to the impairment of ovarian function associated with hormone deficiency. Therefore, measures to prevent and treat osteoporosis are taken to relieve symptoms and reduce the risk of fractures, including calcium supply through pharmacological therapies. However, there is little discussion about approaches to bone regeneration under osteoporotic conditions. Therefore, the present work consists of a survey of articles and patents, without and with time restriction (2008 to 2017), aiming to group information about the hydroxyapatite applied in bone repair due to osteoporosis. Thus, the search banks of articles were Scopus, Web of Science and Scielo. For patents Espacenet, INPI and USPTO. Thus, the results obtained show the use of hydroxyapatite incorporated with metals and / or drugs used in the treatment of osteoporosis to improve osteogenesis due to osteoporosis fractures, however, these studies are recent requiring more exploration, revealing the importance of the study in this field.

Keywords: calcium phosphate, tissue engineering, osteogenesis.

1. Introdução

Há uma tendência mundial do crescimento da população com 60 anos ou mais. Porém, a longevidade pode não estar associada a um envelhecimento saudável [1], uma vez que estão mais vulneráveis à osteoporose, doença caracterizada pela redução da massa óssea e deterioração na microarquitetura do tecido ósseo [2].

Em virtude dessa patologia, a fragilidade óssea progride, assim como, a viabilidade de fraturas. Logo, as fraturas oriundas da osteoporose justificam a perda funcional e consequentemente o comprometimento da qualidade de vida do indivíduo afetado.

Os efeitos dessa enfermidade são mais prevalentes nas mulheres, na pós-menopausa, em razão da função ovariana, que é notavelmente modificada pelo envelhecimento dos ovários e danos reprodutivos. Esses comportamentos estão associados à deficiência do hormônio estrogênio, e não há uma causa genética ou mecânica [3]. A osteoporose pode ser classificada em dois tipos: osteoporose tipo I, sendo a mais comum em mulheres e associada com a deficiência de estrogênio, e osteoporose tipo II, proveniente do envelhecimento e tendo como principal fator de influência a redução na dieta de cálcio e vitamina D [4,5].

Nesse contexto, medidas de prevenção são realizadas para suprir a deficiência de cálcio, dentre elas, o uso de terapia de reposição hormonal, [6-8], uso de drogas antiabsortivas, bem como, compostos derivados de plantas por ter estrutura similar ao estrogênio [9], suplementos naturais que contêm cálcio e sintéticos [10-12].

Verifica-se que, embora a literatura tenha dado bastante atenção a abordagens preventivas como o suprimento da deficiência de cálcio por novas terapias farmacológicas e físicas, menos discussões têm sido direcionadas ao estudo de regeneração óssea em condições de osteoporose [13-15].

Nesse contexto, a hidroxiapatita é uma biocerâmica muito usada em processo de reparação óssea por ser a principal constituinte da parte inorgânica do osso humano, além disso, apresenta propriedades biológicas favoráveis como biocompatibilidade [16-17].

Esse biomaterial pode ser modificado com incorporação de íons metálicos e consequentemente acarretar melhoramento de suas propriedades biológicas, físico-químicas, propriedades mecânicas e antimicrobianas [18-20].

Os modelos animais desempenham um papel fundamental para a pesquisa relacionada ao tecido ósseo, e especialmente na avaliação das características biológicas, dentre outras, no metabolismo envolvido no processo de regeneração óssea, [21-23] em

condições fisiológicas e patológicas, além disso, a ovariectomia é o modelo mais utilizado para estudo da fisiopatologia, diagnóstico e terapia de osteoporose [24-25].

Portanto, este trabalho teve por objetivo apresentar uma busca de artigos e patente, de modo a reunir informações sobre hidroxiapatita com aplicação em regeneração óssea tendo como causa determinante da fratura a fragilidade óssea devido à osteoporose.

2. Metodologia

Este trabalho foi realizado com buscas realizadas em bases de artigos científicos e patentes. Foram pesquisados artigos nas bases *Scopus*, *Web of Science* e *Scielo*. As competências tecnológicas foram pesquisadas nos seguintes bancos de patentes: *Espacenet* (Escritório Europeu), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO, Escritório Norte-americano) e o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. As palavras-chave utilizadas foram: *hydroxyapatite*, *osteoporosis*, “*bone tissue engineering*” e “*bone regeneration*”, as quais também foram combinadas utilizando aspas e o conector aditivo AND. Todas as buscas foram realizadas com os termos em língua inglesa, exceto para a base INPI, onde as buscas foram realizadas em português. As pesquisas foram realizadas no mês de fevereiro de 2018 e estiveram baseadas em informações contidas nos campos resumo, palavras-chave e títulos.

As pesquisas, de artigos, foram realizadas de duas formas: sem restrição de tempo e com restrição de tempo de 2008 a 2017 e já para patentes apenas sem restrição de tempo.

3. Resultados e Discussão

3.1 Pesquisa de artigos nas bases de dados *Scopus*, *Web of Science* e *Scielo*

A investigação das palavras-chave selecionadas nos bancos de dados *Scopus*, *Web of Science* e *Scielo* resultou na elaboração das Tabelas 1, 2 e 3. É notório que há um grande número de estudos envolvendo *hydroxyapatite* assim como para a *osteoporosis*, buscadas separadamente, entretanto, uma vez associados estes termos, com as demais palavras-chave no presente estudo, são observados que estes resultados diminuem drasticamente.

Portanto, nas Tabelas 1, 2 e 3 ao comparar-se os tempos de publicação dos artigos, dos dados sem limitação de tempo com os dados restritos ao interstício de 2008 a 2017, foi observado que há um registro mais significativo de artigos neste intervalo, o que indica que os estudos relacionados ao material pesquisado têm adquirido maior atenção nesta última década. Ao se utilizar a combinação das palavras: *hydroxyapatite AND osteoporosis AND “bone regeneration”* e *hydroxyapatite AND osteoporosis AND “bone tissue engineering”*, que delimitam o objeto deste estudo, nota-se que foram encontrados 65 e 48 artigos para a primeira combinação, respectivamente, nas bases *Scopus* e *Web of Science* e 10 e 14 artigos

para a segunda combinação, respectivamente. Apenas um artigo foi localizado na base Scielo para as combinações supramencionadas, no entanto, não aborda a finalidade do trabalho, pois trata-se de síntese e caracterização de materiais.

Tabela 1 - Quantidade de publicações encontradas no banco de dados *Scopus*.

Palavras-chave	Publicações (todos os anos- 2017)	Publicações (2008-2017)
<i>Hydroxyapatite</i>	42.084	21.681
<i>Osteoporosis</i>	77.928	36.748
<i>“Bone tissue engineering”</i>	5.847	5.095
<i>“Bone regeneration”</i>	24.604	14.724
<i>Hydroxyapatite and osteoporosis</i>	620	356
<i>Hydroxyapatite AND osteoporosis AND “bone regeneration”</i>	80	65
<i>Hydroxyapatite AND osteoporosis AND “bone tissue engineering”</i>	10	10

Fonte: Autoria própria, 2018.

Tabela 2 - Quantidade de publicações encontradas no banco de dados *Web of Science*.

Palavras-chave	Publicações (todos os anos- 2017)	Publicações (2008-2017)
<i>Hydroxyapatite</i>	39.294	23.828
<i>Osteoporosis</i>	54.805	29.443
<i>“Bone tissue engineering”</i>	5.228	4.514
<i>“Bone regeneration”</i>	10.664	8.558
<i>Hydroxyapatite AND osteoporosis</i>	654	450
<i>Hydroxyapatite AND osteoporosis AND “bone regeneration”</i>	52	48
<i>Hydroxyapatite AND osteoporosis AND “bone tissue engineering”</i>	15	14

Fonte: Autoria própria, 2018.

Tabela 3 - Quantidade de publicações encontradas no banco de dados *Scielo*.

Palavras-chave	Publicações (todos os anos até 2017)	Publicações (2008-2017)
<i>Hydroxyapatite</i>	399	260
<i>Osteoporosis</i>	1296	915
<i>“Bone tissue engineering”</i>	73	73
<i>“Bone regeneration”</i>	275	275
<i>Hydroxyapatite AND osteoporosis</i>	5	5
<i>Hydroxyapatite and osteoporosis and “bone regeneration”</i>	1	1
<i>Hydroxyapatite AND osteoporosis and “bone tissue engineering”</i>	0	0

Fonte: Autoria própria, 2018.

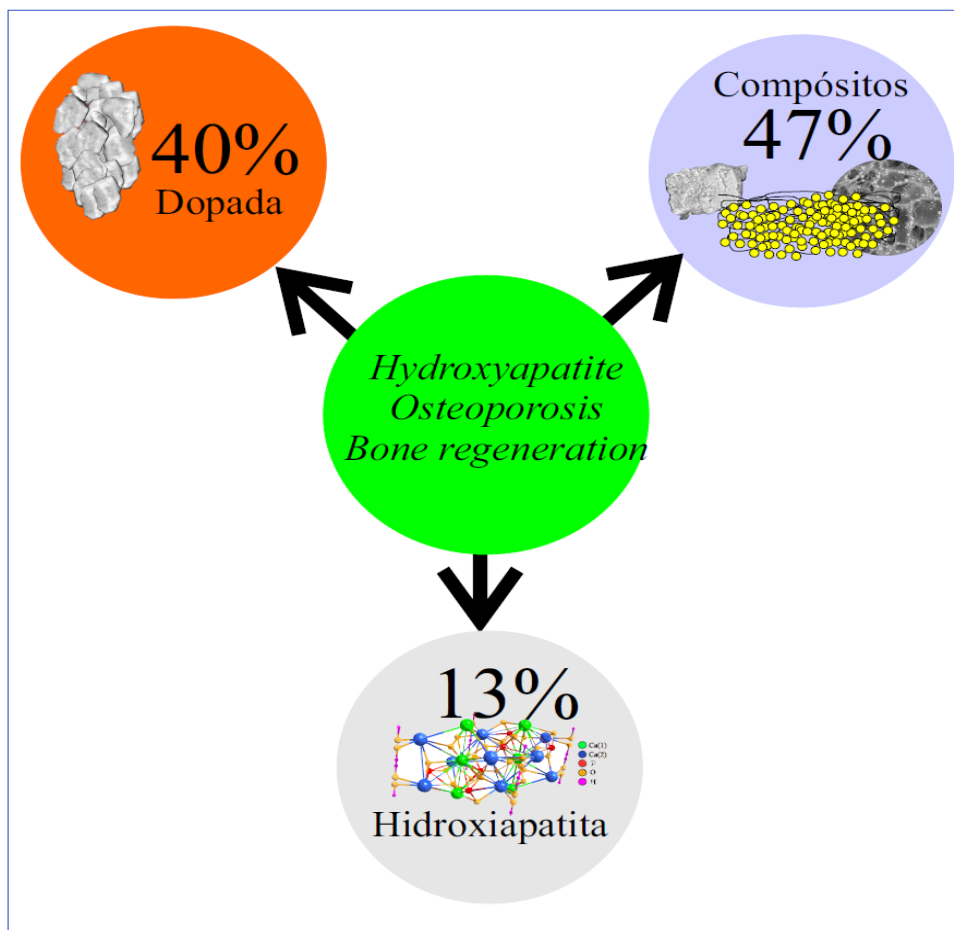
Assim, ao verificar a combinação da palavra-chave: *hydroxyapatite AND osteoporosis AND “bone tissue engineering”*, 10 artigos foram encontrados na base *Scopus*, porém, apenas 01 artigo discute material para implante em defeitos oriundos de osteoporose, intitulado “ *Combination of bone tissue engineering and BMP-2 gene transfection promotes bone healing in osteoporotic rats*”, publicado no ano de 2008, por Tang e colaboradores, pesquisadores do Departamento de Fisiologia, Universidade Nacional de Chonbuk, Coréia do Sul. Este artigo aborda o uso da engenharia de tecido ósseo autógeno e transfecção de genes da proteína-2 morfogenética do osso humano, de modo, a melhorar o processo de regeneração óssea em ratas ovariectomizadas [26]. Entretanto, esta pesquisa não se refere à utilização da hidroxiapatita com vistas ao tratamento de fraturas oriundas da osteoporose, conforme o escopo deste trabalho.

Dentre os 65 artigos encontrados na base *Scopus* envolvendo a palavra-chave *hydroxyapatite AND osteoporosis AND “bone regeneration”*, 30 artigos abordam o tema de regeneração óssea. A Figura 1 apresenta a quantidade de artigos do material aplicado na forma de hidroxiapatita pura, dopada ou como compósito para regeneração óssea de fraturas oriundas de osteoporose.

Extrai-se da Figura que há 4 trabalhos envolvendo a hidroxiapatita pura, mostrando que sua aplicação é reduzida. Já com a hidroxiapatita dopada, 12 trabalhos foram encontrados revelando que tal uso tem ganhado espaço, assim como, na forma de compósito, pois 14 estudos demonstram que há uma tendência no uso desse material no processo de regeneração óssea de fraturas oriundas de osteoporose. Embora, existam esses trabalhos com a hidroxiapatita pura, dopada e como compósito, o campo de estudo ainda

permite exploração uma vez que é possível incorporar metais e/ou substâncias ainda não estudadas, que possam auxiliar no processo de osteogênese de fraturas oriundas da osteoporose.

Figura 1- Representação da quantidade de artigos encontrados sobre a delimitação do tema.



Fonte: Autoria própria, 2018.

Ao analisar os artigos da Figura 1, o trabalho mais recente é o de Alghamdi e colaboradores (2013), que consiste na produção de um filme de fosfato de cálcio pela técnica radiofrequência de *magnetron-sputter* para revestir implantes dentários. Tal material foi aplicado em cêndilos femorais de ratas com osteoporose, mostrando, resultados promissores na osseointegração [27].

Já para a hidroxiapatita dopada com metais o trabalho mais atual é o realizado por Li e colaboradores (2017), que trata da incorporação de lítio em fosfato de cálcio, e como este procedimento teve resultados favoráveis no processo de osteogênese na regeneração óssea de defeitos críticos nas ratas com osteoporose [28]. Outro estudo que merece destaque é o apresentado por Tao e colaboradores (2016), em que os autores incorporaram

o íon estrôncio por deposição eletroquímica na hidroxiapatita, realizaram implantes em ratas com osteoporose, obtendo resultados excelentes de regeneração óssea[29].

No tocante a estudos envolvendo compósitos à base de hidroxiapatita o trabalho mais recente é o de Kettenberger e colaboradores (2017). Nesse estudo, foi sintetizado um compósito a partir de ácido hialurônico e nano-hidroxiapatita incorporada com zoledronato e aplicado na regeneração óssea de ratas com osteoporose, tendo como resultado um material promissor e versátil para a osseointegração. [30].

Ao avaliar os 30 artigos obtidos da combinação de palavras-chave *hydroxyapatite AND osteoporosis AND “bone regeneration”* que abordam regeneração óssea, 12 artigos apresentam informações relevantes, tais como os métodos de síntese, o tipo de material e potencial aplicação mostrando a viabilidade que estes materiais têm apresentado para regeneração óssea oriundas de fraturas devido a osteoporose. A Tabela 4 apresenta 9 artigos, mostrando os materiais, métodos de síntese e aplicações e os 3 restantes já foram mencionados.

Ressalta que 18 artigos não abordavam a regeneração óssea em fraturas causadas por osteoporose. Pois, tinham como finalidade a liberação de fármacos para tratamento da osteoporose, outros enxertos autógenos para regeneração óssea, e os restantes, embora usando hidroxiapatita dopada ou na forma de compósito para regeneração óssea é “*in vitro*” ou não estão direcionando a fraturas provocadas por osteoporose

Além destes trabalhos listados descritos na Tabela 4, há um significativo número de trabalhos na literatura que envidam esforços no sentido de sintetizar hidroxiapatita e incorporar metais e/ou outras substâncias, como, polímeros formando compósitos, de modo, a obter várias propriedades biológicas o que possibilita sua aplicação na área da saúde humana e em especial na regeneração óssea. Isto se deve à estrutura química da hidroxiapatita que permite a acomodação de ampla variedade de substituintes catiônicos e aniônicos [31].

De acordo com a Tabela 4, os trabalhos relacionados à preparação de hidroxiapatita dopada com estrôncio, magnésio e zinco envolvem aplicações na regeneração óssea de animais osteoporóticos ou em revestimento de implantes principalmente de titânio por melhorar a osseointegração de animais com osteoporose. Vale destacar, a relevância dos íons dopantes, que são empregados por atuarem ou auxiliarem em alguma etapa do metabolismo ósseo ou mesmo devido a melhorias em suas propriedades antibacterianas.

Tabela 4 - Relação dos materiais sintetizados nos artigos e suas aplicações.

Material	Método de síntese	Aplicação	Caracterizações para confirmar a formação do osso	Início da neoformação óssea	Referência
Hidroxiapatita incorporadas com estrôncio	precipitação por via úmida	<i>Regeneração óssea em defeitos ósseos de ratas com osteoporose</i>	Histológico e Microtomograifa computadorizada	A partir de 8 semanas	[33]
Nanohidroxiapatita /colágeno/ poliácido láctico contendo estrogênio	Adquiridas comercialmente- Esterilização e lavagem	<i>Regeneração óssea de células-tronco periodontal de ratas com osteoporose</i>	Histológico	A partir de 6 semanas	[34]
Nanohidroxiapatita com e sem colágeno	Sol-gel	<i>Regeneração óssea em defeitos ósseos de cabras com osteoporose</i>	Histológico e Microscopia de Transmissão eletrônica	A partir de 6 semanas	[35]
Hidroxiapatita substituída com Mg, Sr e Zn, revestindo o titânio	Co-precipitação e deposição eletroquímica	<i>Revestimento de implantes para regeneração óssea em defeitos ósseos de ratas com osteoporose</i>	Histológico e Microtomograifa computadorizada	A partir de 12 semanas	[36]
Hidroxiapatita dopada com estrôncio e administração de hormônio humano paratireoide	Co-precipitação	<i>Regeneração óssea em defeitos ósseos de ratas com osteoporose</i>	Histológico e Microtomograifa computadorizada	A partir de 12 semanas	[37]

Simvastatina/Hidroxiapatita	Deposição eletroquímica	<i>Revestimento de implantes para regeneração óssea em defeitos ósseos de ratas osteoporótica</i>	Histológico	A partir de 4 semanas	[38]
Compósito de hidroxiapatita/peptídeo p-15	Adquirido comercialmente	<i>Regeneração óssea em defeitos ósseos de ratas com osteoporose</i>	Histológico e Microtomograifa computadorizada	A partir de 4 semanas	[39]
Hidroxiapatita dopada com magnésio e titânio	Co-precipitação	<i>Regeneração óssea em defeitos ósseos de ratas com osteoporose</i>	Histológico e Microtomograifa computadorizada	A partir de 12 semanas	[40]
<i>Scaffolds</i> de hidroxiapatita contendo gene osteoprotegina em BMSCs	Adquirido comercialmente e esterilizadas	<i>Regeneração óssea em defeitos ósseos de ratas com osteoporose</i>	Histológico e Microtomograifa computadorizada	A partir de 4 semanas	[41]

Fonte: Aatoria própria, 2018

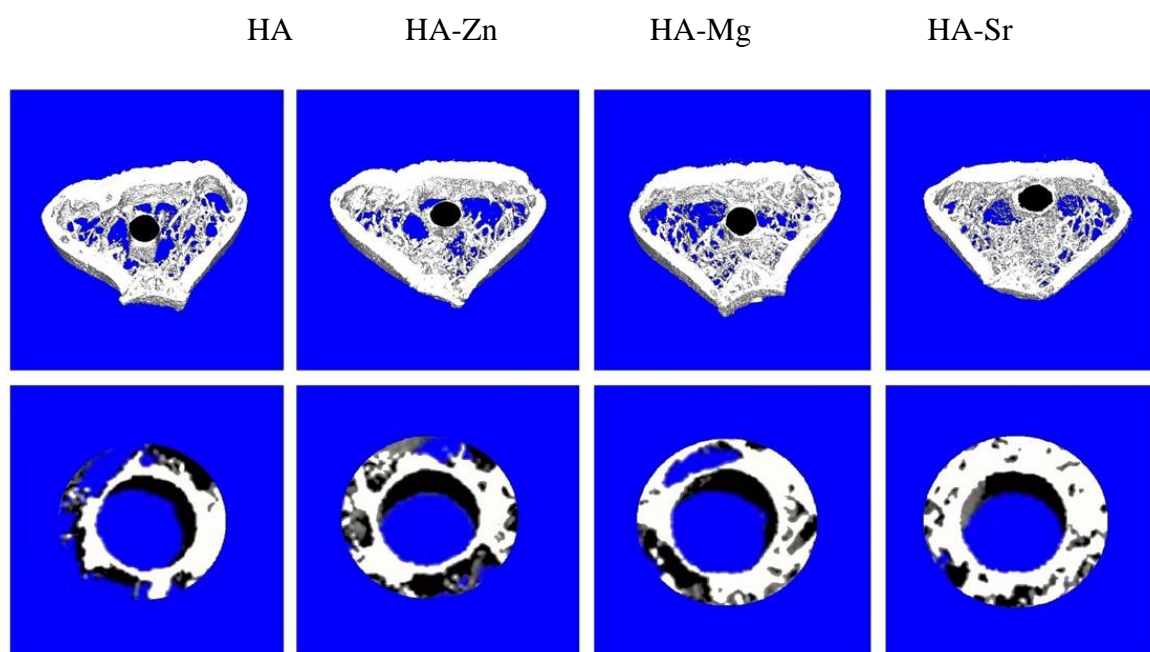
Por outro lado, na Tabela 4, constatam-se estudos envolvendo a hidroxiapatita na forma de compósitos aplicados na regeneração óssea em fraturas de animais osteoporóticos ou em revestimentos de implantes para melhorar a osseointegração nos defeitos realizados em animais osteoporóticos. Ressalta-se, que nos trabalhos listados na Tabela 4 que envolvem a formação de compósitos ou *scaffolds* de hidroxiapatita, os materiais são obtidos pela adição à hidroxiapatita de substâncias como ácido polilático, quitosana, colágeno, hormônios e fármacos, além de células-tronco, de modo, a constituir um compósito ou *scaffolds*, objetivando o melhoramento do processo de osseointegração em fraturas de animais osteoporóticos.

Deste modo, as substâncias que constituem o compósito atuam no metabolismo do osso na reabsorção e/ou neoformação óssea. Segundo Canettieri e colaboradores (2009), cujo estudo realiza a formação do compósito de alendronato de sódio e hidroxiapatita, a finalidade de usar o fármaco é devido ser empregado no tratamento da osteoporose, logo, juntamente com a hidroxiapatita melhora o processo de regeneração óssea em fraturas oriundas da osteoporose [32].

Portanto, com os resultados obtidos é possível verificar nos trabalhos relatados que o processo de regeneração óssea em fraturas provocadas por osteoporose aplicando como biomaterial a hidroxiapatita dopada ou na forma de compósito ou *scaffolds*, demonstraram resultados excelentes na neoformação de osso de animais com osteoporose. Isso, foi ratificado pelas caracterizações histológicas e microtomografias computadorizada que possibilitam inferir tal afirmação, sendo que, essas técnicas foram as mais usadas para permitir a sugestão de formação de osso novo.

Vale destacar, que nesses resultados obtidos referente a formação do osso em animais com osteoporose levou um período mínimo de 4 semanas para início da neoformação óssea. Isso é variável uma vez que depende do tipo de material aplicado, do tamanho do defeito em qual local foi realizado, dentre outros. Na Figura 2 será mostrado imagens de Micro-CT de animais com defeito preenchido com Hidroxiapatita incorporada com zinco (HA-Zn), magnésio (HA-Mg) e estrôncio (HA-Sr). É possível verificar claramente que existe diferenças de neoformação óssea dos animais com preenchidos com os materiais e o grupo controle (hidroxiapatita-HA) [30].

Figura 2 - Imagens 3-D de micro-CT do fêmur após 12 semanas dos implantes dos grupos HA, HA-Zn, HA-Mg e HA-Sr.



Fonte: Adaptada de Zhou *et al.*, 2016, p. 230. Reproduzido com a permissão elsevier (anexo).

Embora existam registros na literatura referente a hidroxiapatita e a incorporação de metais ou substâncias que permitem configurar um compósito ou *scaffolds*, a maior parte destes trabalhos são recentes e necessitam ainda de investigações, inclusive de testes, *in vitro* e *in vivo*, com outros íons metálicos dopantes da hidroxiapatita, em fraturas oriundas de osteoporose. A maioria dos estudos ainda se limita a estudar os efeitos destes íons sobre a inibição bacteriana e os mecanismos que norteiam as propriedades osteogênicas destes íons associadas às apatitas, e ainda necessitam de maior elucidação e compreensão.

3.2 Busca nos principais bancos de patentes

Os resultados das buscas de competências tecnológicas nas bases de patentes Espacenet (*European Patent Office*), USPTO (*United States Patent and Trademark Office's*) e INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) utilizando as palavras-chave separadas e combinadas: *hydroxyapatite*, *osteoporosis*, “*bone tissue engineering*”, “*bone regeneration*” estão apresentadas na Tabela 5.

Analisando os dados da Tabela 5, foi possível constatar-se 91 registros de patentes com a palavra *hidroxiapatita* e 433 registros com a palavra *osteoporose* para a base INPI. Entretanto, quando cruzadas estas duas palavras-chave, não foram encontrados resultados. Para a palavra-chave “*bone tissue engineering*”, foram encontrados dois resultados de patentes na base INPI. A patente nº BR 10 2015 007042 0 A2 compreende uma composição vítrea bioativa à base de

óxido de nióbio. Por sua vez, a patente nº PI 1106507-9 A2 consiste em uma composição à base de hidroxiapatita parcialmente substituída por nióbio, a qual ratifica que têm se tornado recorrentes as investigações de composições de hidroxiapatita substituída por íons metálicos para aplicações em engenharia tecidual óssea.

Tabela 5 - Quantidade de patentes encontradas nos bancos de patentes Espacenet, USPTO e INPI.

Palavras-chave	Espacenet	USPTO	INPI
<i>Hydroxyapatite</i>	7386	18499	91
<i>Osteoporosis</i>	>10000	27386	433
<i>“Bone tissue engineering”</i>	313	759	2
<i>“Bone regeneration”</i>	1131	2431	28
<i>Hydroxyapatite AND osteoporosis</i>	41	4	0
<i>Hydroxyapatite AND osteoporosis AND “bone regeneration”</i>	1	0	0
<i>Hydroxyapatite AND osteoporosis AND “bone tissue engineering”</i>	1	0	0

Fonte: Autoria própria, 2018.

Na base USPTO, foram encontrados quatro resultados, para a combinação *Hydroxyapatite AND osteoporosis*. A patente nº 9.199.005 aborda um processo relacionado à obtenção de fosfato de cálcio bifásico (BCP), contendo carbonato e íons magnésio, zinco e flúor. Por fosfato de cálcio bifásico, considera-se que seja um sistema constituído de hidroxiapatita e fosfato tricálcico (TCP). O biomaterial que contém uma variedade de íons substituintes deve ser utilizado como suplemento mineral diário. A partir de ensaios de ovariectomia em ratas, constatou-se viabilidade da administração oral e intravenosa do biomaterial, uma vez comprovado que há prevenção de perda de massa em ossos corticais e trabeculares. As demais patentes não estavam relacionadas com o objetivo do estudo uma vez que abordavam aplicações diferentes.

As associações entre palavras-chave *“Hydroxyapatite and osteoporosis and bone regeneration”* e *“Hydroxyapatite and osteoporosis and bone tissue engineering”* resultaram em um único registro para cada uma na base Espacenet e nenhum registro na base USPTO.

Na Tabela 6 encontram-se informações sobre algumas destas patentes que possuem mais relevância referente à potencial para aplicação destes materiais na engenharia tecidual óssea e, portanto, no tratamento da osteoporose. Algumas destas patentes, foram buscadas pela

associação dos termos *Hydroxyapatite AND osteoporosis* de modo a ampliar o número de resultados.

Tabela 6 - Características das patentes encontradas na base Espacenet.

Título	Classificação	País (Ano)	Resumo
Método de preparação e aplicação de hidroxiapatita com estrôncio incorporado	A61L	China (2016)	Síntese de hidroxiapatita com estrôncio incorporado para aplicações em preenchimento ósseo ou na formação de <i>scaffolds</i> para regeneração tecidual óssea e tratamento/cura da osteoporose
Implante artificial ativo regenerado para terapia de osteoporose e seu método de preparação	A61L	China (2014)	Compreende um implante dentário à base de titânio e liga de titânio e junta óssea artificial com revestimento de hidroxiapatita a fim de promover a atividade regenerativa em fraturas oriundas da osteoporose.
Compósito para reforço de defeitos ósseos decorrentes da osteoporose	A61L	Letônia (2015)	Composição à base de hidroxiapatita e fosfato tricálcico 90/10 grânulos, para reforço local de fraturas oriundas da osteoporose.
Material compósito multifásico orgânico/inorgânico à base de hidroxiapatita	A61L	China (2016)	Consiste em um material multifásico com fases orgânicas (quitosana, colágeno bovino) e inorgânicas (óxido de grafeno e hidroxiapatita). Enquanto o óxido de grafeno melhora a adesão de células-tronco e sua diferenciação em células ósseas, quitosana e colágeno conferem biocompatibilidade e o meio adequado para a proliferação celular. Pode ser potencialmente utilizado no tratamento da osteoporose.

Fonte: Autoria própria, 2018

A patente nº CN101628124 (A), intitulada “*Preparation method and application of strontium-incorporated hydroxyapatite*”, depositada por inventores chineses, trata acerca do método de preparo de uma composição à base de hidroxiapatita com estrôncio incorporado, depositada sobre uma superfície vítrea de borato ou fosfato (contendo íons Ca^{2+} e Sr^{2+}) para uso em engenharia tecidual óssea, para tratamento de fraturas oriundas da osteoporose. Quando cruzadas as palavras-chave “*hydroxyapatite AND osteoporosis AND ‘bone regeneration’*”, foi encontrado como resultado apenas a patente “*Regenerated active artificial implant for osteoporosis therapy and preparation method thereof*” cujo resumo se encontra na Tabela 6. As demais patentes cujas características estão descritas na Tabela 6, correspondem a invenções encontradas na base *Espacenet* utilizando a combinação *hydroxyapatite and osteoporosis*.

A análise dos resultados da combinação entre as palavras-chave *hydroxyapatite* AND *osteoporosis* nas bases de patentes EPO e USPTO, conduziram à conclusão de que o maior número de ocorrências se deve a composições baseadas em fosfatos de cálcio bifásicos, contendo hidroxiapatita e fosfato tricálcico em diferentes proporções. A Tabela 6 registra alguns trabalhos bastante significativos no que diz respeito ao desenvolvimento de novas competências tecnológicas que têm como intuito o tratamento das fraturas oriundas da osteoporose. No tocante as classificações são todas do tipo A61L27 que caracterizam por serem relacionadas a aplicação na área da saúde conforme será demonstrado na tabela a seguir.

Os dados obtidos revelaram que ainda há um *gap* no quanto ao número de invenções relacionadas ao uso de hidroxiapatita pura ou dopada com íons metálicos para aplicações em engenharia tecidual óssea quando associadas ao uso destas biocerâmicas para preenchimento ou regeneração de fraturas características da osteoporose. Assim, é de importância crucial, o desenvolvimento de novos biomateriais que tenham propriedades satisfatórias, com baixas respostas imunogênicas do organismo, além da ausência da possibilidade de transmissão de doenças infecto-contagiosas, como alternativa para o tratamento da osteoporose, a fim de ampliar a longevidade e melhorar a qualidade de vida da população.

4. Conclusão

A partir da análise dos resultados apresentados, sabe-se que a utilização de hidroxiapatita tem adquirido importância na regeneração óssea em fraturas provocadas por osteoporose, segundo as inovações mais recentes, sobretudo nos últimos dez anos, principalmente a hidroxiapatita incorporada com íons metálicos e/ou na forma de compósito ou *scaffolds* hormônio, fármaco e polímeros. Portanto, resultados obtidos com a aplicação destes biomateriais demonstram a neoformação óssea em processo de regeneração óssea nas fraturas causadas pela osteoporose. Isso foi ratificado pelas as caracterizações histológicas e Micro-CT, sendo as mais usadas para inferir a formação de osso novo. Deste modo, a hidroxiapatita incorporada com outros elementos são biomateriais promissores no processo de regeneração óssea para fraturas provocadas pela osteoporose. No entanto, há poucos estudos na literatura acerca do uso de com aplicação desses biomateriais, promovendo a regeneração óssea em fraturas causadas por osteoporose, o que permite mais exploração sobre o tema.

5. Referências

[1] World Population Prospects. Prevention and management of osteoporosis. Disponível em: <https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf>. Acesso: mai. 2017.

- [2] WHO. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO study group. WHO Technical Report Series. 1994; 843:1-129.
- [3] Roman-Blas, JA.; Castañeda, S.; Largo, R.; Herrero-Beaumont, G. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(5):1.
- [4]. Fraser, LA.; Vogt, K.N.; Adachi, J.D. Thabane L. Fracture risk associated with continuation versus discontinuation of bisphosphonates after 5 years of therapy in patients with primary osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2011;7: 157–66.
- [5] Koo, HJ.; Sohn, EH.; Kim, YJ.; Jang, SA.; Namkoong, S.; Kang SC. Effect of the combinatory mixture of *Rubus Coreanus Miquel* and *Astragalus Membranaceus Bunge* extracts on ovariectomy-induced osteoporosis in mice and anti-RANK signaling effect. *Journal Ethnopharmacology*. 2014;151(2):951–9.
- [6] Marsden, J. The menopause, hormone replacement therapy and breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2002;83(1):123–32.
- [7] Reid, IR. Pharmacotherapy of osteoporosis in postmenopausal women: focus on safety. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2002;1(1):93 107.
- [8] Yeh I-T. Postmenopausal hormone replacement therapy: endometrial and breast effects. *Adv Anat Pathol*. 2007;14(1):17–24.
- [9] Miksicek, RJ. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1994;49(2):153–60.
- [10] Jang, S-Y.; Jeong, Y-J.; Kwon, T-K.; Seo, J-H. Effects of water-soluble calcium supplements made from eggshells and oyster shells on the calcium metabolism of growing rats. *Journal of Food Science and Nutrition*. 2010; 15(1):78–82.
- [11] Heaney, RP.; Dowell, MS.; Bierman, J.; Hale, CA.; Bendich, A. Absorbability and cost effectiveness in calcium supplementation. *The Journal of the American College Nutrition*. 2001;20(3): 239–46.
- [12] Hanzlik, RP.; Fowler, SC.; Fisher, DH. Relative bioavailability of calcium from calcium formate, calcium citrate, and calcium carbonate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;313(3):1217–22.
- [13] Namkung-Matthai, H. Appleyard R, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*. 2001; 28:80–86.
- [14] Chao, E.; Inoue, N.; Koo, T.; Kim, Y. Biomechanical considerations of fracture treatment and bone quality maintenance in elderly patients and patients with osteoporosis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2004;(425):12–25.
- [15] Giannoudis, P.; Tzioupis, C.; Almalki, T.; Buckley, R. Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different A basic science perspective. *Injury*. 2007;38(suppl 1): S90–99.
- [16] Lin, K.; Wu, C.; Chang, J. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. *Acta Biomaterialia*. 2014, 10, 4071-4102
- [17] Supová, M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceramics international*, 2015. 41, 9203-9231.
- [18] Farzadi, A.; Bakshi, F.; Solati-Hashjin, M.; Asadi-Eydivand, M.; Osman, N.A.A. Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. *Ceramics International*. 2014, 40 (4), 6021-6029.
- [19] Dos Santos, MVB.; Osajima, J.A.; Silva Filho, E C Da . Hidroxiapatita: suporte para liberação de fármacos e propriedades antimicrobianas. *Ceramica*. 2016, 62, p. 256-265.
- [20] Kolmas, J.; Groszyk, E.; Kwiatkowska-Różycka, D. Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties. *BioMed Research International*, 2014, 1-15.

- [21] Cancedda, R.; Giannoni, P.; Mastrogia, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*. 2007,28:4240-4250.
- [22] Buma, P.; Schreurs, W. Verdonchot N. Skeletal tissue engineering: From in vitro studies to large animal models. *Biomaterials*. 2004,25:1487–1495.
- [23] Mooney, MS. MI. Animal models for bone tissue engineering of critical-sized defects (CSDs), bone pathologies, and orthopedic disease states. In: Hollinger J, Einhorn T, Doll B, Sfeir C (eds). *Bone Tissue Engineering*. Boca Raton, FL: CRC Press. 2005,217–244.
- [24] Wronski, T.; Cintrón, M.; Dann, L. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcified Tissue International*. 1988,43:179–183.
- [25] Egermann, M.; Goldhahn, J.; Schneider, E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporosis International*. 2005;16(suppl 2): 129–138.
- [26] Tang, Y.; Tang, W.; Lin, Y.; Lin, Long, J.; L.; Wang, H.; Liu, L.; Tian, W. Combination of bone tissue engineering and BMP-2 gene transfection promotes bone healing in osteoporotic rats. *Cell Bioogy International*. 2008, Sep;32(9):1150-7.
- [27] Alghamdi, HS.; Cuijpers, VMJL.; Wolke, JGC. Van Den Beucken, J.J.J.P., Jansen, J.A. Calcium-phosphate-coated oral implants promote osseointegration in osteoporosis. *Journal Dental Research*. 2013;92(11):982-990.
- [28] Li, L.;Peng, X.; Qin, Y.; Pan, H.; Li, B. Li, L. Acceleration of bone regeneration by activating Wnt/ β -catenin signalling pathway via lithium released from lithium chloride/calcium phosphate cement in osteoporose. *Materials Scientific Reports*. 2017, 24;7:45204-45216.
- [29] Tao, ZS.; Bai, BL.; He, XW.; Liu, W.; Li, H.; Zhou, Q.; Sun, T.; Huang, ZL.; Tu, KK.; Lv, YX.; Cui, W.; Yang, L. A comparative study of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant's osseointegration for osteopenic rats. *Medical Biological Engineering Computing*. 2016, 54(12):1959-1968.
- [30] Kettenberger, U.; Luginbuehl, V.; Procter, P.; Pioletti, DP. In vitro and in vivo investigation of bisphosphonate-loaded hydroxyapatite particles for peri-implant bone augmentation. *Journal Tissue Engineering Regenerative Medicine*. 2017, 11(7):1974-1985.
- [31] Xian, L.; Chongyun, B.; Hockin, H.; Xu, K.; Jian, P.; H.; Ping, W. En L. Osteoprotegerin gene-modified BMSCs with hydroxyapatite scaffold for treating critical-sized mandibular defects in ovariectomized osteoporotic rats. *Acta Biomaterialia*. 2016, 42, 378–388.
- [32] Canetti, ACV.; Colombo, CED.; Chin, CM.; Faig-Leite, H. Femur bone repair in ovariectomized rats under the local action of alendronate, hydroxyapatite and th. *International Journal of Experimental Pathology*. 2009, 90(5): 520–526.
- [33] Chandran, S.; Suresh, BS.; Hari,KVS.;Varma, HK.; John, A. Osteogenic efficacy of strontium hydroxyapatite micro-granules in osteoporotic rat model. *Journal Biomaterials Applications*. 2016, 31(4):499-509.
- [34] Ling-Ling, E.; Xu, WH.; Feng, L.; Liu, Y.;Cai, DG.; Wen, N. Zheng, W-J. Estrogen enhances the bone regeneration potential of periodontal ligament stem cells derived from osteoporotic rats and seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *International Journal of Molecular Medicine*. 2016, Jun; 37(6): 1475–1486.
- [35] Alt, V.; Cheung, WH.; Chow, SK.; Thormann, U.; Cheung, EN.; Lips, KS.; Schnettler, R.; Leung, KS. Bone formation and degradation behavior of nanocrystalline hydroxyapatite with or without collagen-type 1 in osteoporotic bone defects - An experimental study in osteoporotic goats. *Injury*. 2016, Jun;47 Suppl 2:S58-65.
- [36] Tao, ZS.; Bai, BL.; He, XW.; Liu, W.; Li, H.; Zhou, Q.; Sun, T.; Huang, ZL. Tu, KK.; Lv, YX.; Cui, W.; Yang, L. A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats. *Materials Science Engineering C Materials for Biological Applications*. 2016, 62:226-32.
- [37] Tao, ZS.; Bai, BL.; He, XW.; Liu, W.; Li, H.; Zhou, Q.; Sun, T.; Huang, ZL. Tu, KK.; Lv, YX.; Cui, W.; Yang, L. Intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34)

increases fixation of strontium-doped hydroxyapatite coating titanium implants via electrochemical deposition in ovariectomized rat femur. *Journal of Biomaterials Applications*. 2016,30(7) 952–960.

[38] Fang, W.; Zhao, S.; He, F.; Liu, L.; Yang, G. Influence of simvastatin-loaded implants on osseointegration in an ovariectomized animal model. *BioMed Research International*. Volume 2015 (2015), Article ID 831504, 1-7.

[39] Hestehave, PR.; Rasmussen, M.; Overgaard, S.; Ding, M. Effects of P-15 Peptide Coated Hydroxyapatite on Tibial Defect Repair in Vivo in Normal and Osteoporotic Rats. *BioMed Research International*. Volume 2015 (2015), Article ID 253858, 1-14.

[40] Li, X.; Li, Y.; Liao, Y.; Li, J.; Zhang, L.; Hu, J. The effect of magnesium-incorporated hydroxyapatite coating on titanium implant fixation in ovariectomized rats. *The International Journal of Oral Maxillofacial Implants*. 2014 Jan-Feb;29(1):196-202.

[41] Udhayakumar, G.; Muthukumarasamy, N.; Velauthapillai, D.; Santhosh, SB.; Asokan, V. Magnesium incorporated hydroxyapatite nanoparticles: Preparation, characterization, antibacterial and larvicidal activity. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016, 1-10.

CAPÍTULO 2: Artigo científico

Hidroxiapatita dopada com cério: Síntese, caracterização, atividade antibacteriana e citocompatibilidade *in vitro*

Marcos Pereira da Silva¹, Thátilla Wanessa da Silva¹, Ewerton Gomes Vieira^{1,2}, Andréia Bagliotti Meneguini^{1,3}, Hernane da Silva Barud³, André Capaldo Amaral³, Creusa Sayuri Tahara Amaral³, Ana Cristina Vasconcelos Fialho⁴, Josy Antevelli Osajima¹, Edson Cavalcanti da Silva Filho^{1*}

1. Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados, Universidade Federal do Piauí, Teresina 64049-550, Brasil.
2. Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina 64049-550, Brasil.
3. Universidade Araraquara – UNIARA, Araraquara 14801-320, Brasil
4. Departamento de Patologia e Clínica Odontológica, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina-PI, Brasil

Resumo

A hidroxiapatita (HAp), $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, é um material que possui alta biocompatibilidade e bioatividade em tecidos humanos. Uma alternativa para potencializar os seus efeitos biocompatíveis, é por meio da incrementação de outras espécies iônicas substituindo os íons cálcio na sua estrutura da HAp. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização da HAp e dopagem da HAp com diferentes concentrações de Ce^{3+} e realizar teste de atividade antibacteriana e viabilidade celular. A síntese da hidroxiapatita (HAp) e dopada com cério (Ce^{3+}) (1,75%, 2,50% e 5,00% m/m) ocorreu pelo método da precipitação. As caracterizações por DRX e FTIR confirmaram a fase hidroxiapatita. Os dados obtidos pelo EDS e XPS confirmaram a presença do íon Ce^{3+} . Os valores da razão atômica Ca/P para a HAp foi de 1,59 e a razão (Ca+Ce)/P variou entre 1,46 a 1,55. A propriedade antibacteriana dos materiais foi avaliada pelo teste de contato direto. As bactérias testadas foram a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O material contendo 5,00% de cério obteve 48,30% e 45,48% de inibição de crescimento das cepas gram-positiva e gram-negativa, respectivamente., sendo bem superior quando comparado ao material sem o cério. Os resultados da citocompatibilidade mostraram que o material não afeta a viabilidade celular, sugerindo que os materiais não são citotóxicos. It can be concluded that metallic doped material is promising for future applications in the field of tissue engineering.

Palavras-chave: hidroxiapatita, biocerâmica, atividade antibacteriana, citotoxicidade, biocompatibilidade, engenharia de tecidos.

Abstract

Hydroxyapatite (HAp), $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$, is a material that has high biocompatibility and bioactivity in human tissues. An alternative to enhance its biocompatible effects is by increasing other ionic species by replacing the calcium ions in the HAp structure. Thus, the present work aimed to the synthesis and characterization of HAp and doping of HAp with different concentrations of Ce^{3+} and to perform test of antibacterial activity and cellular viability. The synthesis of hydroxyapatite (HAp) and doped with cerium (Ce^{3+}) (1.75%, 2.50% and 5.00% w / w) occurred by the precipitation method. Characterization by XRD and FTIR confirmed the hydroxyapatite phase. The data obtained by EDS and XPS confirmed the presence of the Ce^{3+} ion. The Ca / P atomic ratio values for HAp were 1.59 and the ratio $(\text{Ca} + \text{Ce}) / \text{P}$ ranged from 1.46 to 1.55. The antibacterial property of the materials was evaluated by the direct contact test. The bacteria tested were *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The material containing 5.00% of cerium obtained 48.30% and 45.48% of growth inhibition of gram-positive and gram-negative strains, respectively, being much higher when compared to the material without cerium. Cytocompatibility results showed that the material does not affect cell viability, suggesting that the materials are non-cytotoxic. It is possible to conclude as a promising material for future applications in the field of tissue engineering.

Keywords: Hydroxyapatite, bioceramic, antibacterial activity, cytotoxicity, biocompatibility, tissue engineering.

1. Introdução

O enxerto ósseo autógeno é a primeira alternativa a ser utilizada para a regeneração do tecido ósseo devido as suas propriedades osteogênicas [1]. No entanto, os enxertos têm disponibilidade limitada, tais como a necessidade de procedimentos cirúrgicos com possíveis infecções locais e reabsorções progressivas do material [2]. Como resultado, pesquisas científicas estão desenvolvendo novos biomateriais para a sua substituição [3]. Assim, os enxertos sintéticos podem ser uma interessante alternativa, devido apresentarem características intrínsecas, tais como biocompatibilidade e similaridade química com os tecidos ósseos dos seres vivos, aliadas com suas propriedades de osteocondução e osteoindução [4].

Os principais materiais usados como enxertos sintéticos são os fosfatos de cálcio e sua classificação pode ser dada através de sua razão molar Ca/P que varia entre 0,5 e 2,0 [5]. Um excelente exemplo desses fosfatos é a hidroxiapatita (HAp), $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, é um material que possui alta biocompatibilidade e bioatividade em tecidos humanos [6-8].

Existem em muitos procedimentos cirúrgicos a formação de uma interface química do tipo biomaterial/osso e, conseqüentemente, a fixação biológica, na qual a estrutura óssea vivo penetra no espaço livre do biomaterial, provocando assim, a fixação permanente do osso [9]. Porém, esses procedimentos podem apresentar problemas de infecções bacterianas muitas vezes difíceis de serem controladas durante o período pós-operatório [10], e, conseqüentemente, o uso excessivo de antibióticos que podem não fornece proteção suficiente, levam a uma possível perda do material ósseo e a podem gerar cepas resistentes de bactérias que são difíceis de tratar [11].

Assim, os mecanismos de defesa ativados pelo sistema imunológico podem ser reforçados pela introdução de agentes antibacterianos que possuam interação biológica com o biomaterial [12]. Uma das alternativas é a capacidade de substituição dos íons da HAp, por meio da dopagem, por outros que possuam propriedades antibacterianas. Exemplos incluem

prata (Ag^+), cobre (Cu^{2+}), zinco (Zn^{2+}), selênio (SeO_3^{2-}), estrôncio (Sr^{2+}), os íons lantanídeos ($\text{Ln}^{3+} = \text{Ce}^{3+}, \text{Ga}^{3+}, \text{Sm}^{3+}$) [13-15], citando alguns que podem ocupar sítios da hidroxiapatita devido ser íons de tamanho e cargas semelhantes. Essa capacidade de substituição iônica é, portanto, uma alternativa que pode melhorar os aspectos biológicos, mecânicos [16], físicos, químicos, [17,18], antimicrobianos [19] e de biocompatibilidade do material [20,21].

O objetivo desta pesquisa é sintetizar uma hidroxiapatita dopada com Ce^{3+} e avaliar suas propriedades antibacterianas quanto à inibição do crescimento de duas linhagens bacterianas gram-positivas e gram-negativas, bem como avaliar sua viabilidade celular por meio de ensaio de citotoxicidade.

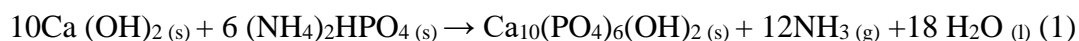
2. Parte Experimental

2.1 Materiais

Os reagentes utilizados foram hidróxido de cálcio (VETEC) – $\text{Ca}(\text{OH})_2$; fosfato de amônio dibásico (VETEC) - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; Nitrato de cério (III) hexahidratado (III) (SIGMA-ALDRICH) - $(\text{Ce}(\text{NO}_3)_2)$. Para os ensaios de cultivo das colônias bacterianas, foram usados Brain Heart Infusion Broth (HIMEDIA); Blood Agar Base (COLUMBIA); salina fisiológica (NaCl 0,9%) e água deionizada. Para o ensaio *in vitro* as células foram obtidas da linhagem celular: GM07492 (Fibroblasto humano). A concentração celular/poços foi de 1×10^5 . O meio de cultura composto por: DMEM (Gibco/Thermofisher), suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) (nutricell), penicilina e estreptomicina 10U/mL (sigma). Os reagentes disponíveis foram utilizados sem nenhum tratamento de purificação.

2.2. Síntese da HAp

A síntese da HAp foi realizada pelo método de precipitação. Os reagentes $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ foram utilizados segundo a razão Ca/P de 1,67 (Eq. (1)).



Os reagentes foram dissolvidos em água deionizada, a síntese ocorreu à temperatura ambiente, sob agitação durante aproximadamente 3h (pH = 10-11). A solução resultante foi centrifugada, lavadas com água deionizada e o produto foi seco em estufa a 110 °C por 24h [22].

2.3 Síntese da HAp dopada com Ce

A síntese da HAp dopada Ce^{3+} também foi realizada através do método da precipitação. Para a realização da síntese utilizou uma relação percentual referente a substituição do íon Ca^{2+} pelo íon Ce^{3+} . Assim, a adição da quantidade de dopante foi dada em x mols ($x_{Ce} = 1,75\%$; 2,50% e 5,00%) com relação ao número de mol íon Ca^{2+} ($Ca_{10-x}Ce_x(PO_4)_6(OH)_2$). Os pós obtidos foram denominados HAp-Ce-x (em que $x = 1,75$; 2,50 e 5,00).

2.4. Caracterização dos materiais

2.4.1 Difractometria de Raios X (DRX)

Os parâmetros de DRX foram medidos no intervalo de 5° a 75°, taxa de varredura de 2° min^{-1} e tempo de exposição de 40 minutos no equipamento LABX – XDR 600, Shimadzu, Cu – $K\alpha$ ($\lambda = 1,5406\text{\AA}$). Os tamanhos médios dos cristalitos foram estimados usando a equação Debye–Scherrer (Eq. (2)) [23]:

$$X_s = 0,9\lambda/\beta\cos\theta \quad (2)$$

sendo X_s é o tamanho de cristalito em nanômetro (nm); λ é o comprimento de onda dos raios-X incidentes (nm) ($\lambda = 0,15406$ nm para a radiação CuK) e β é a FWHM (Full Width at Half Maximum), do pico de difração sob consideração (rad); θ é o ângulo de difração (°).

2.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos usando o espectrofotômetro Varian 660-IR pelo método da pastilha em KBr, em 32 varreduras na região de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

2.4.3. Análise Térmica

A análise termogravimétrica (TGA) foram realizadas no aparelho SDT Q600 V20.9 Build 20 da TA Instruments utilizando aproximadamente 5 mg de amostra com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ em atmosfera de Argônio com fluxo de 100 mL min⁻¹ em porta amostra de alumina na faixa de temperatura de 25 a 1000 °C.

2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A análise morfológica e composição dos materiais sintetizados foi investigada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) com fonte de elétrons por emissão de campo FEG (QUANTA 250 FEI) acoplado a Espectroscopia de Energia Dispersa (EDS).

2.4.5 A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

As amostras foram submetidas a fonte de raios X. O equipamento da ScientaOmicron, modelo ESCA+ espectrômetro equipado com uma fonte de raios X monocromática (K-Alpha 1486,6 eV) e um analisador de elétrons do tipo hemisférico, com alta resolução e equipado com 125 canais individuais de detecção. Durante as medidas a pressão da câmara de análise é da ordem de 2×10⁻⁹ mbar e os espectros de survey e alta resolução são registrados com uma resolução em energia de 50 e 20 eV, respectivamente.

2.5 Atividade antibacteriana por contato direto

As cepas bacterianas utilizadas foram das espécies *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Gram-positive bacteria) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Gram-negative bacteria). A partir das culturas bacterianas mantidas em ágar nutriente a 4 °C, transferiu-se uma alçada do crescimento bacteriano para um tubo falcon contendo 3,0 mL do meio Brain Heart Infusion Broth a 3,0% (BHI), seguido de incubação a 37 °C por 24h. A partir desta cultura em BHI preparou-se uma suspensão bacteriana padronizada para uma densidade equivalente a 0.5 na escala Mac Farland, aproximadamente 1.5 x 10⁸ UFC/mL. Em seguida foram realizadas

diluições decimais seriadas, em solução salina fisiológica, obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^4$ CFU/mL para ambos os microrganismos. O teste antimicrobiano foi realizado por contato direto, segundo a metodologia de Zheng e Zhu [24], tendo como resultado a contagem de unidade formadora de colônias (CFU). Para a realização do teste a suspensão bacteriana padronizada foi submetida a diluições seriada decimais até obtenção da diluição 10^{-4} ($1,5 \times 10^4$ UFC/mL), no qual 2000 μ L desta suspensão diluída foram transferidas para um tubo tipo falcon esterilizado, ao qual foi adicionado 2000 μ g do biomaterial. Para determinação do efeito inibitório, 100 μ L desta suspensão foram transferidos para placas de Petri contendo o meio ágar Blood Agar Base e semeadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky pelo método *spread plate*. As placas foram incubadas na estufa microbiológica por 24h a 37 °C. Em seguida, a contagem das unidades formadoras de colônia (CFU) foi realizada. O teste foi realizado em triplicata no qual, no controle positivo, os produtos foram substituídos por uma solução salina (2000 μ L) para posterior comparação das soluções com os produtos testados. O efeito inibitório produzido por cada solução-teste foi calculado através da equação $\eta = (N_1 - N_2) / N_1$, onde η é definido como o efeito inibitório, N_1 é a média aritmética das unidades formadoras de colônia das placas controle, N_2 é a média aritmética das unidades formadoras de colônia de cada uma das soluções testadas e os resultados expostos em percentagem.

2.6 Citocompatibilidade (MTT)

O ensaio de citocompatibilidade *in vitro* foi realizado de acordo com procedimentos padrão (ISO10993-5: 2009). A viabilidade celular foi analisada por MTT ensaio colorimétrico do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. As células (Fibroblasto humano GM07492) foram semeadas em placa de cultura de 96 poços, mantidas em meio de cultura, enriquecido com SBF e antibióticos. Foram encubadas em estufa 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Simultaneamente, foram preparados os extratos das amostras e dos controles na concentração 20 mg/mL, mantidos em estufa 37°C,

por 24 horas. Após 24 horas, ocorreu a substituição do meio DMEM (Dulbecco's modified eagle médium) pelo extrato, realizadas em triplicata e mantidas em condições de cultivo por 24 horas. Posteriormente, após às 24 horas, os poços foram lavados com PBS uma 1 vez, e foram adicionados 50 μ L de MTT. A placa de cultura foi novamente incubada em estufa 37°C por 4 horas. Após incubação, 100 μ L de isopropanol foram adicionados aos poços e homogeneizados delicadamente para a solubilização dos cristais de formazan. Como controle positivo foram usados DMEM + 30% de DMSO e como controle negativo, foram usados DMEM + soro bovino fetal + antibióticos. Os valores de densidade óptica (DO) obtidos em um comprimento de onda (λ) de 570 nm num espectrofotômetro foram convertidos em percentagens de viabilidade celular. O valor de DO de cada amostra foi convertido em percentagens de viabilidade celular em relação a um grupo controle negativo (DMEM + 10% FBS = 100% de viabilidade celular) e submetido a análise estatística (ANOVA-ONEWAY e FISHER'Spost hoc test) em nível de significância de 5%. Foi realizado um grupo controle positivo (referência ao efeito citotóxico) pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO 30% v / v) ao meio de cultura (DMEM + 10% FBS)

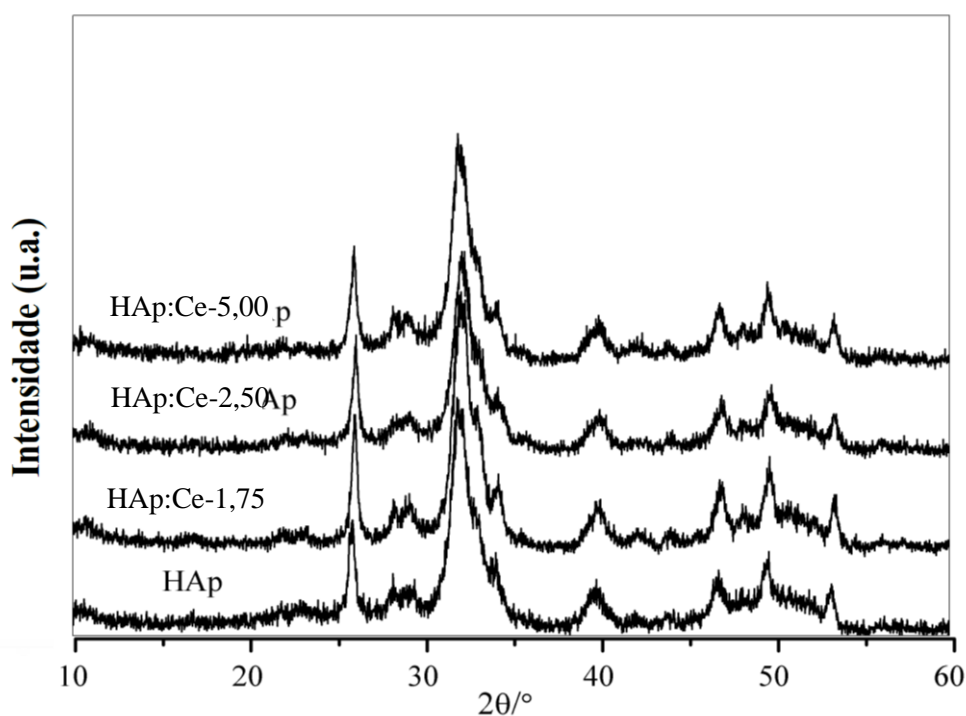
3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização dos materiais

3.1.1 Difractometria de Raios X (DRX)

A hidroxiapatita pura e as dopadas com diferentes concentrações de cério (% m/m) foram obtidas pelo método de precipitação. Os difratogramas da HAp e HAp-Ce-x: (onde x = 1,75%, 2,50% e 5,00%) mostram que os materiais são cristalinos e não possuem fases intermediárias, como mostrado na Figura 1. Os picos de XRD para HAp foram indexados a JCPDS 001-1008. As presenças dos planos no DRX (Figura 1) são característicos da fase hidroxiapatita. É possível observar pequenas mudanças significativas no DRX das amostras HAp-Ce-1,75, HAp-Ce-2,50 e HAp-Ce-5,00.

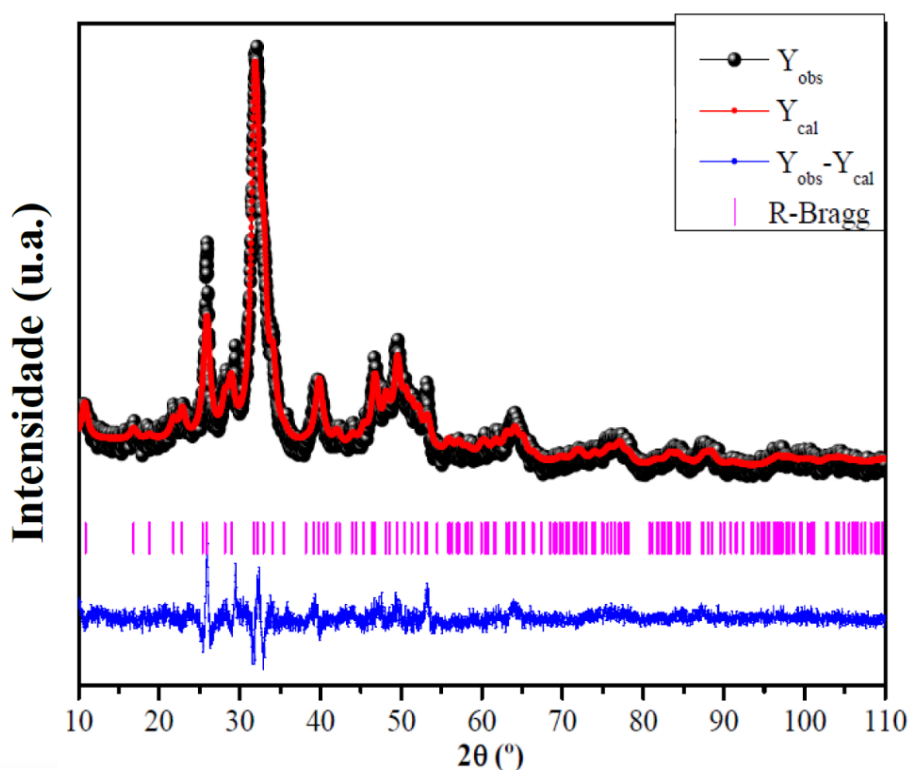
Figura 1- DRX de hidroxiapatita e HAp dopadas com Ce^{3+} sintetizado pelo método da precipitação.



Acredita-se que essas pequenas alterações de cristalinidade quando comparado com HAp foram ocasionadas pela adição de pequenas quantidades de Ce^{3+} que contribuíram para os deslocamentos dos picos e que causaram pequenas alterações na cristalinidade dos materiais. Isso pode ser atribuído às diferenças de carga entre Ca^{2+} e íons Ce^{3+} . Ou seja, os íons de Ce^{3+} provavelmente podem ter íons Ca^{2+} da HAp, resultando em uma alteração estequiometria e, consequentemente, uma melhora na cristalinidade do material.

Essas variações no tamanho (Tabela 1) podem ser atribuídas a diferença no tamanho e a quantidade adicionada de íons Ce^{3+} na estrutura da HAp, uma vez que o raio iônico do Ce^{3+} (0.107 nm) é maior do que do Ca^{2+} (0.100 nm) [25]. A Figura 2 mostra um bom ajuste entre os padrões de DRX observados e os resultados de ajuste teórico calculados para HAp-Ce (Refinamento de Rietveld).

Figura 2- Gráfico de refinamento pelo método Rietveld da HAp dopado com Ce^{3+} sintetizado pelo método da precipitação.



Foi possível detectar que os difratogramas das amostras sintetizadas tiveram similaridade com o cartão de número 26205 (ICSD), com estrutura do tipo hexagonal e grupo espacial P63/m. Seus parâmetros de célula unitária são $a = b = 0,943$ nm e $c = 0,689$ nm para HA, e $a = b = 0,942$ nm e $c = 0,675$ nm, para a HAp-Ce. Para esse refinamento o valor de χ^2 (fator de convergência) foi igual a 1,845 para a amostra de HA e 1,759 para amostra HAp-Ce, indicando que o refinamento foi bem-sucedido [26]. Para estruturas tetragonal, ortorrômbica, romboédrica ou hexagonal os valores de Rwp devem ser próximos a 8-10% [27]. Os valores de Rwp para as amostras de HAp e HAp-Ce foram, 10,60% e 11,06%, respectivamente. Após o refinamento, foi observado as seguintes porcentagens de fase para a HAp-Ce foi de 96,98% referentes a fase da hidroxiapatita e 3,02%; corresponde a fase do cério (ICSD 43381), com grupo espacial P63/mmc.

Entre os planos cristalinos observados, (002), (211), (202), (310), (203) e (213) foram localizados em 2θ igual a $25,90^\circ$; $31,90^\circ$; $34,20^\circ$; $39,79^\circ$; $46,70^\circ$ e $49,60^\circ$, respectivamente. A Tabela 1 mostra o valor do tamanho médio dos cristais que foram calculados pelo método de Debye-Scherrer como mostrado na Eq. (1).

Tabela 1- Tamanho médios de cristalitos sintetizados.

Amostras	FWHM ($^\circ$)	Tamanho do Cristalito (nm)
HAp	0,314	25,870
HAp-Ce-1,75	0,275	29,587
HAp -Ce-2,50	0,275	29,583
HAp -Ce-5,00	0,236	34,506

$$FWHM = Full\ width\ half\ maximum.$$

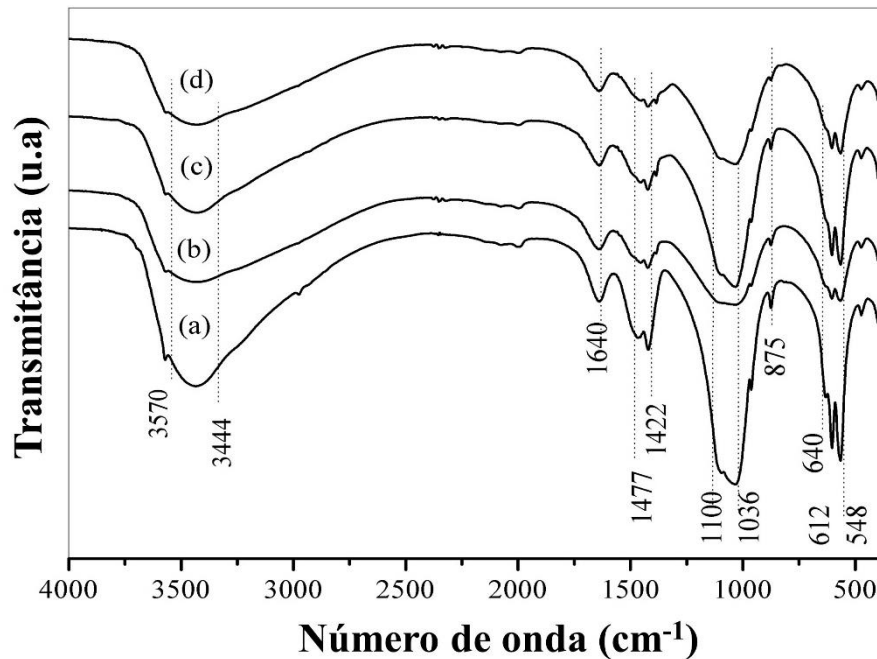
3.1.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 3 mostra os espectros para a região de infravermelhos de HAp e HAp dopados com Ce^{3+} . Os espectros para a HAp, Figura 3 (a), mostram as bandas em 472 cm^{-1} e 548 cm^{-1} correspondendo às vibrações de deformações assimétricas do agrupamento HPO_4^{2-} (P-O-H).

A banda no valor de 612 cm^{-1} refere-se à deformação assimétrica P-O do grupo PO_4^{3-} e 640 cm^{-1} é a banda de deformação do OH. Bandas discretas em torno de 1900 cm^{-1} e na região de 875 cm^{-1} podem ser atribuídas à presença do íon carbonato (CO_3^{2-}). As bandas de 1100 cm^{-1} e 1036 cm^{-1} correspondem à vibração de alongamento assimétrica do grupo PO_4^{3-} . As bandas de 1640 cm^{-1} e 3444 cm^{-1} correspondem à deformação e alongamento, respectivamente, do grupo hidroxila da água e a faixa a 3570 cm^{-1} corresponde a hidroxila (OH) da estrutura da hidroxiapatita [28-29].

As análises de FTIR mostradas na Figura 3 indicam que não houve diferenças significativas entre os espectros, mostrando estruturas similares entre HAp e HAp dopada, revelando que, mesmo com a dopagem, a fase de hidroxiapatita foi formada [30].

Figura 3 - FTIR da (a) HAp, (b) Hap-Ce-1,75 (c) Hap-Ce-2,50 e (d) Hap-Ce-5,00.

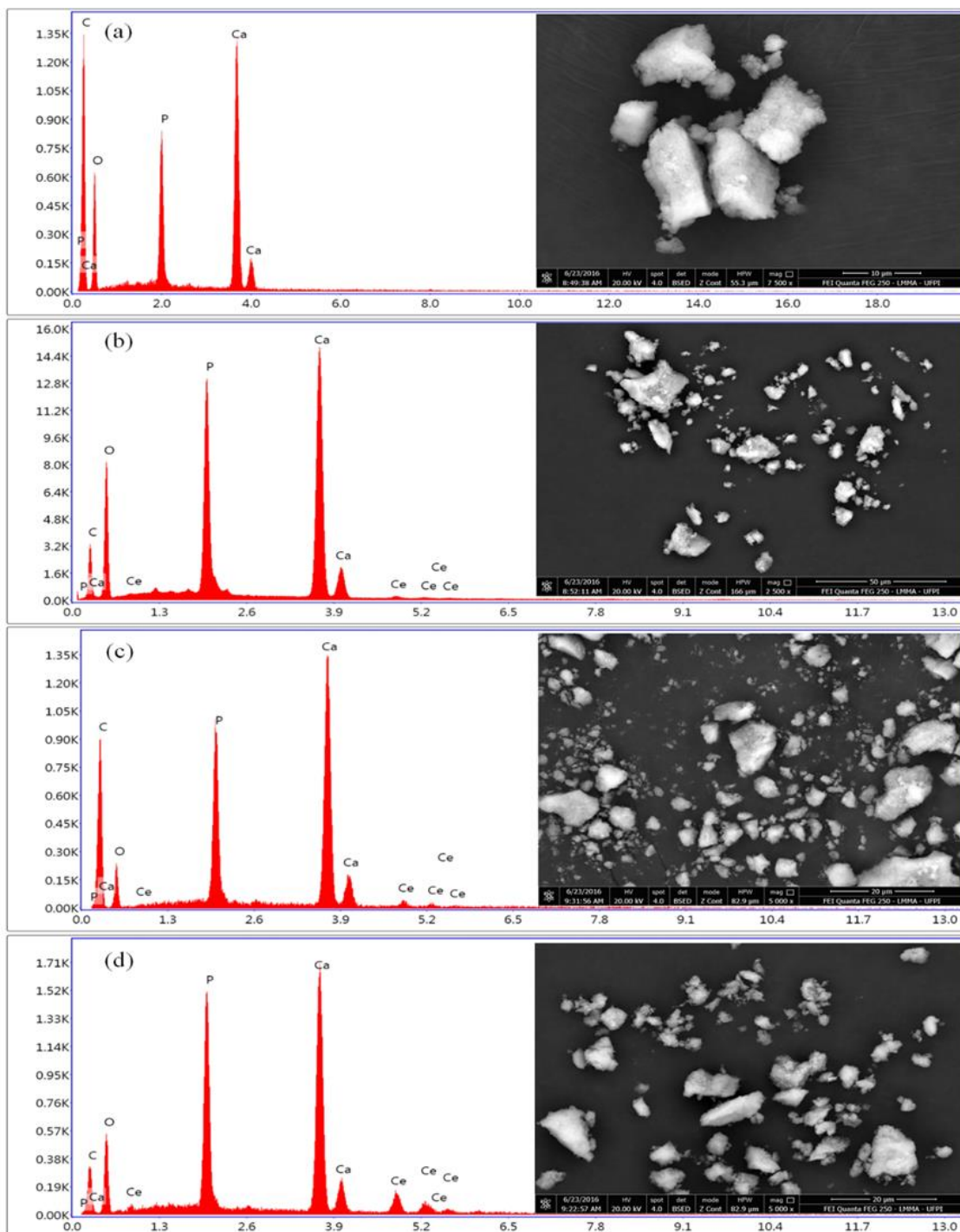


3.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A Figura 4 mostra as micrografias (MEV) e os espectros de EDS. A imagem de MEV obtida para a amostra de HAp e das amostras dopadas com o cério, revela a formação de partículas aglomeradas de maneira não uniformes com superfície irregular. Observa-se que a presença do íon cério não alterou a morfologia, uma vez que a partículas da HAp e das dopadas são semelhantes, como podem ser observadas na Figura 4.

A análise por EDS é uma ferramenta importante para a caracterização de materiais, pois permite identificar a composição qualitativa e semi-quantitativa das amostras em pontos específicos da imagem [31].

Figura 4 - MEV-EDS imagens da (a) HAp e (b) HAp-Ce-1,75 (c) HAp-Ce-2,50 e (d) HAp-Ce-5,00.



A presença dos principais componentes da hidroxiapatita (Ca, O, P) e a presença do íon Ce^{3+} nas amostras dopadas são mostradas de forma semi-quantitativa pelo EDS. Os valores da razão atômica Ca/P para a HAp foi de 1,59 e a razão (Ca+Ce)/P variou entre 1,46 a 1,55.

Esses valores são mostrados na Tabela 2. Ressalta que a HAp do tipo deficiente em cálcio é caracterizada por ter a relação Ca/P variando de 1,50 a 1,67 [32].

Tabela 2- Percentagem atômica semi-quantitativa de HAp e HAp dopada com Ce obtida por EDS.

Hidroxiapatita	Ca ou (Ca+Ce)	P	Ca ou (Ca+Ce)/P
HAp	2,70	1,70	1,59
HAp -Ce-1,75	12,23	8,10	1,51
HAp -Ce-2,50	7,00	4,80	1,46
HAp-Ce-5,00	7,44	4,80	1,55

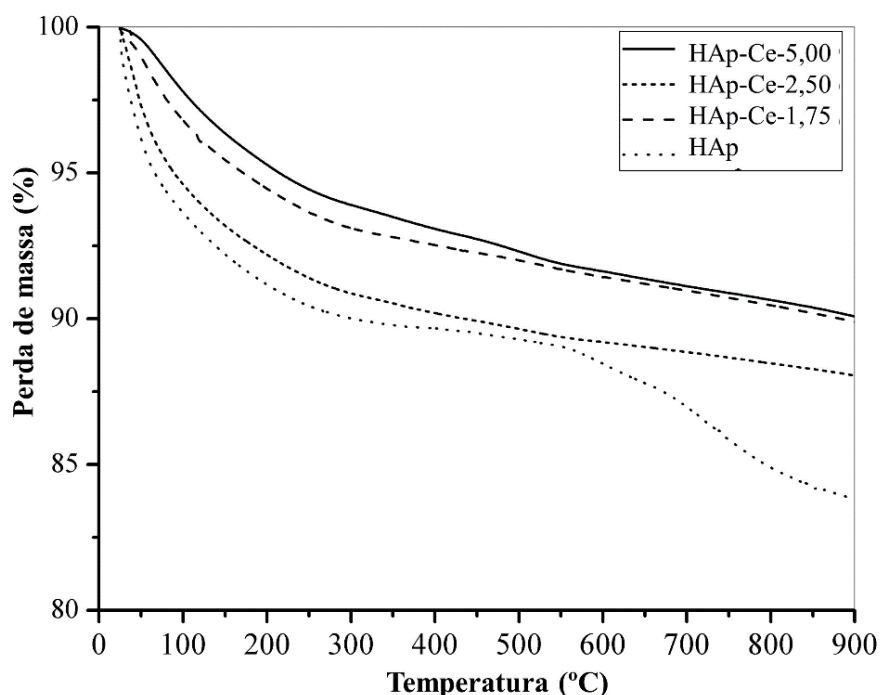
Essas informações corroboram com os dados estruturais/cristalinos fornecidas pelo DRX por meio do qual, acredita-se que a incorporação de Ce^{3+} causou uma alteração na cristalinidade das partículas, bem como, os resultados de tamanho dos cristalitos (Tabela 1).

3.1.4 Análise Térmica

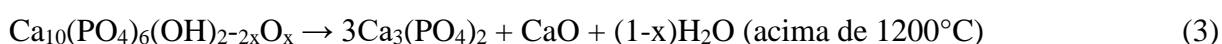
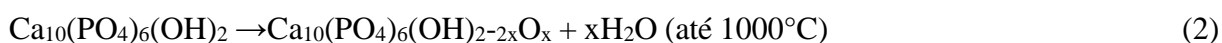
Nas curvas TG, a perda de peso foi observada entre 1,10% e 2,70% perto da região de 100 °C, como mostrado na Figura 5. Este evento está ligado à liberação de água fisicamente adsorvida na superfície. A perda em torno de 1,60% indica a liberação de água também adsorvida na superfície, mas localizada em locais mais internos. Acima dessa temperatura, observamos outro evento de perda de massa que ocorre na faixa de temperatura de 200 °C a 550 °C, com perda de 2,20% em massa.

Isto está associado à remoção de água quimicamente adsorvida. Entre as temperaturas de 575 °C e 900 °C, a temperatura final neste experimento, condensação dos grupos hidroxila presentes na superfície da HAp ocorre, tornando o material um fosfato menos hidratado que experimentou uma massa perda de 2,60% [33-34].

Figura 5 - Curvas TG da HAp; HAp-Ce-1,75; HAp-Ce-2,50 e HAp-Ce-5,00.



Na curva TG, Figura 5, acima da temperatura de 900 °C ocorre um evento de perda de massa relacionado a decomposição da HAp e, por consequência, a perda de grupos OH [35]. Essas etapas de perdas estão mostradas a seguir:



As temperaturas acima de 700 °C correspondem a condensação dos grupos OH e foi observado que a HAp-Ce-2,50 perde cerca de 1,91% de massa, uma quantidade maior do HAp-Ce-1,75 e HAp-Ce-5,00 que perderam cerca de 1,63 e 1,76%, respectivamente. Esse fenômeno indicando uma condensação de grupos hidroxilas na amostra dopada com 2,50% de cério.

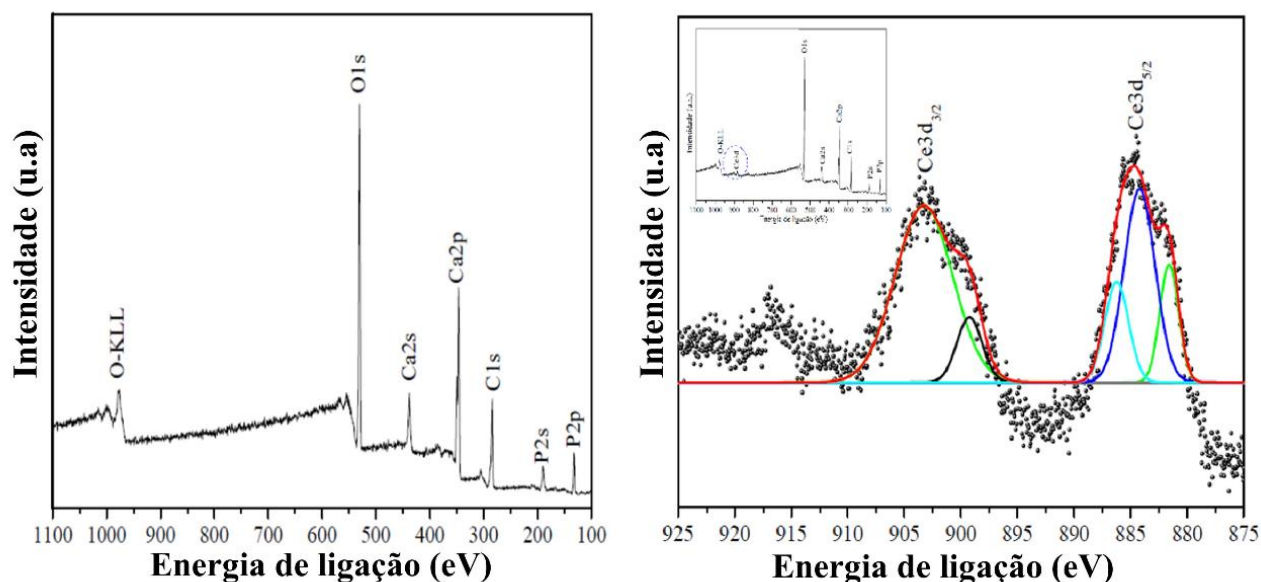
Essas diferentes perdas, pode-se indicar que a substituição pelo íon Ce^{3+} pode estar ocorrendo não somente nos sítios do cálcio como também nos sítios H, onde a amostra HAp-Ce-2,50 pode ter uma menor quantidade de cério substituindo o hidrogênio que as demais amostras dopadas, o que pode está resultando esta diferença. Em outras palavras, as HAp dopadas apresentaram uma maior perda de massa percentual que pode ser atribuída devido à

condensação de grupos OH com a liberação de H₂O. Essa perda é crescente em relação ao aumento da concentração de cério, indicando que as pequenas quantidades de íons Ce³⁺ contribuíram para a hidratação do material.

3.1.5 A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

A Figura 6, mostram os espectros de XPS obtido para a amostra de HA e HAp-Ce-5. Na Figura 6, foram detectados os elementos Ca, P e O através dos picos Ca2s (439,74 eV) e Ca2p (347,54 eV), P2s (187,73 eV) e P2p (131,78 eV), O1s (529,27 eV). Além disso, na Figura 6 é possível observar as linhas de emissão características relativas ao dublete de elétrons ejetados de orbitais 3d do Ce na região entre 880-905 eV [36]. Tal técnica de forma pertinente e convincente garante que ocorreu a incorporação do íon metálico na estrutura do material, demonstrando que a síntese obteve êxito.

Figura 6 - Espectro de XPS para a amostra HAp e HAp-Ce-5,00.



3.2 Atividade Antibacteriana por contato direto

As atividades antibacterianas de HAp e Ce³⁺ dopado contra *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922) são mostradas na Figura 7. Entre os materiais testados, Ce-5,00: HAp

teve o maior efeito inibitório para ambos os grupos de bactérias. Os resultados de inibição de crescimento bacteriano para o material HAp:Ce-5,00 quando comparado com HAp, tiveram um aumento inibitório de cerca de 42,86% para *S. aureus* de 41,85% para *E. coli*. A Figura 8 mostra as fotografias das placas com os resultados obtidos para o crescimento das colônias.

Figura 7- Efeito inibidor de HAp dopada com cério 1,75, 2,50 e 5,00% em linhagens padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922).

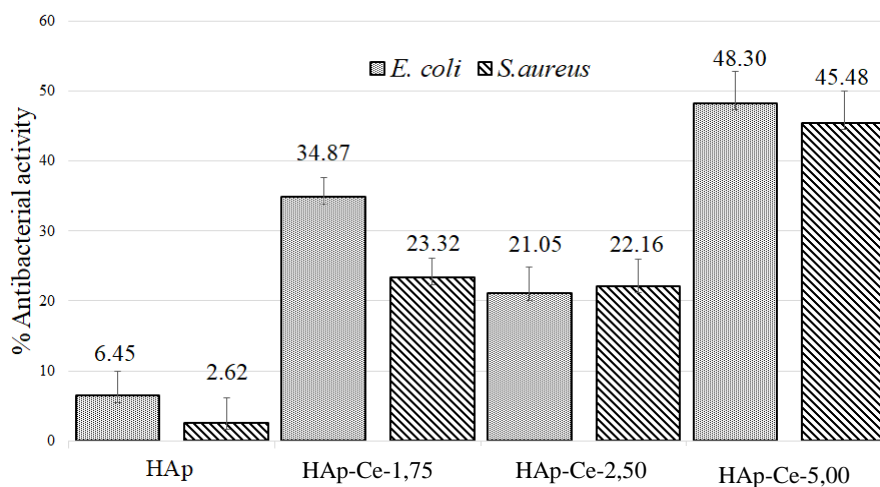
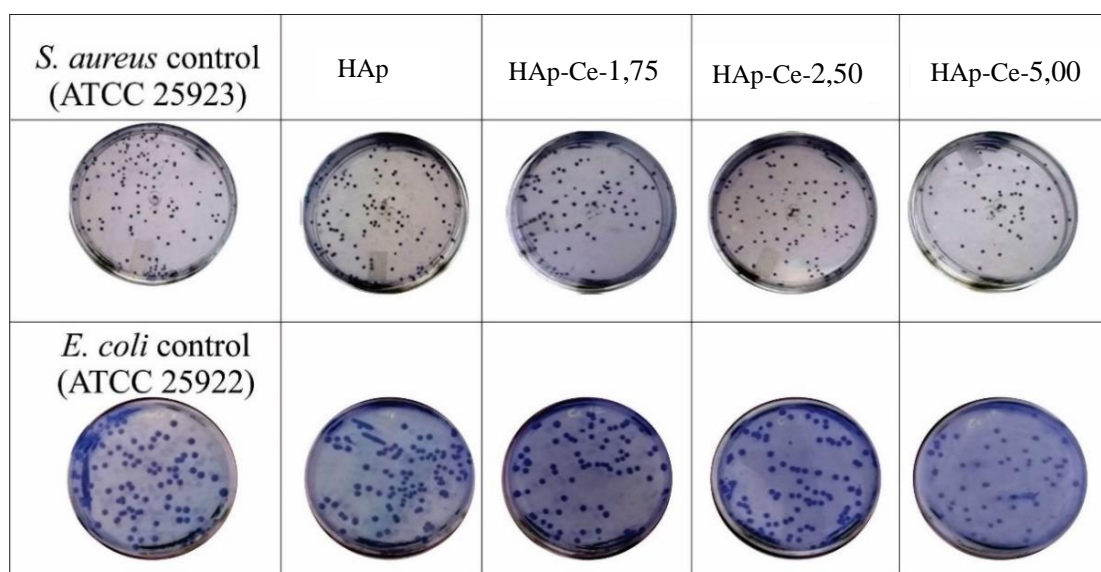


Figura 8 - Imagens das placas sobre o efeito inibitório de HAp dopada com cério 1,75, 2,50 e 5,00% em linhagens padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922).



A inibição do crescimento bacteriano por HAp pode ser explicada pela existência de ligações de hidrogênio na fase de hidroxiapatita exibindo grupos hidroxila e a parede celular de bactérias formadas por peptidoglicano. Quando ocorre a ligação de hidrogênio, o crescimento das paredes das células bacterianas é interrompido, e as bactérias têm seu desenvolvimento comprometido. No entanto, a baixa quantidade de grupos hidroxila na estrutura de HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, não confere ao material uma propriedade 100% antimicrobiana [37].

No caso de amostras dopadas com Ce^{3+} , os mecanismos de atividade antibacteriana do metal ainda não são totalmente compreendidos. Díaz-Visurraga et al. (2011) [38] sugerem quatro mecanismos hipotéticos que são os mais aceitos e relatados na literatura: (1) absorção de íons metálicos, (2) geração de EROs a partir de íons metálicos com subsequente dano oxidativo em suas estruturas celulares, (3) a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir de íons metálicos e (4) acúmulo de dissolução de íons metálicos na membrana bacteriana causando alterações na sua permeabilidade (liberação progressiva de lipopolissacarídeos, proteínas de membrana) pela dissipação da força motriz do próton.

Ciobanu et al. [36] estudaram a atividade antimicrobiana de hidroxiapatita dopada com céria contendo íons Ce^{+4} e Ce^{3+} e encontraram atividade significativa contra *E. coli* e *S. aureus* pelo método de difusão em disco. Em seu trabalho, a hidroxiapatita substituída por 10% de cério apresentou redução microbiana de 31,38% para *E. coli* e 29,01% para *S. aureus*. Os resultados apresentados na Figura 7 e na Figura 8 mostram que a atividade apresentada pelo material dopado com 5,00% de cério é superior à do referido artigo, além de apresentar uma maior resposta contra o *S. aureus*. Isso confirmou que o cério pode melhorar a atividade antimicrobiana do HAp quando substituído em sua estrutura, além de possuir propriedades osteogênicas.

A menor resposta de inibição de Ce^{+3} a *E. coli* pode estar relacionada ao fato de que a estrutura da parede celular das bactérias gram-negativas é mais complexa que a das bactérias

gram-positivas. Isso ocorre porque existe uma camada além da peptidoglicana chamada membrana externa que é composta principalmente de fosfolipídios e lipopolissacarídeos. Uma das funções da membrana externa é proteger a célula bacteriana [39-40]. Infecções nos implantes são geralmente causadas pela bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Uma pesquisa descrita por Trampuz e Zimmerli [41] mostrou que cerca de 30% dos casos de infecções relacionadas ao implante foram causados por *S. aureus*, uma vez que é responsável por infecções de partes moles em regiões osteoarticulares. Este é um resultado importante em vista do aumento de 42,86% do efeito inibitório contra *S. aureus* para HAp:Ce-5,00.

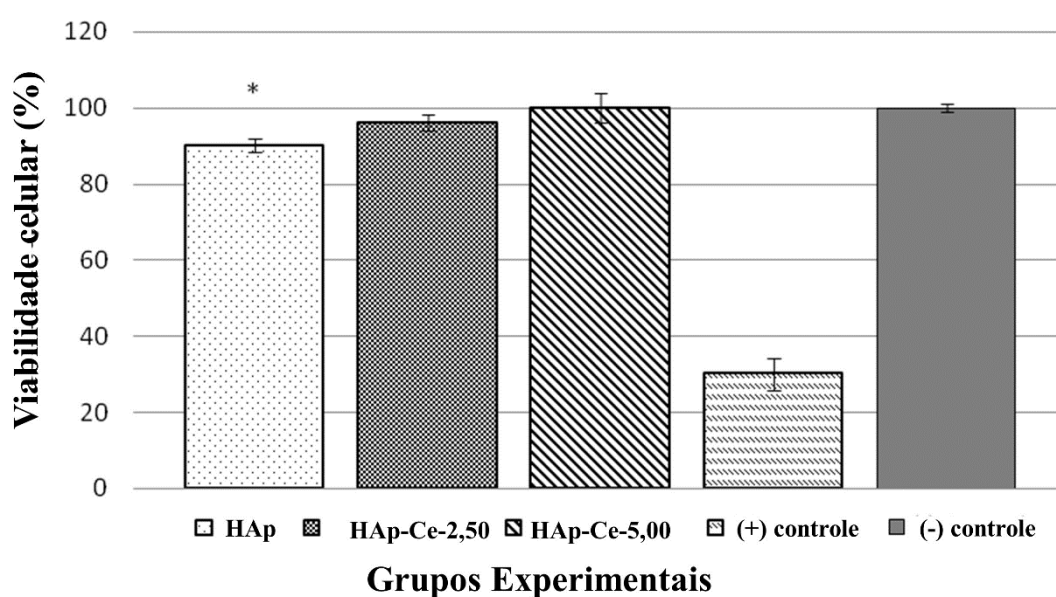
3.3 Citocompatibilidade

A citocompatibilidade para os materiais dopados com cério e HAp foi investigada pelo ensaio MTT. Os resultados, Figura 9, mostraram que nenhuma das amostras testadas tinha níveis de viabilidade compatíveis com um efeito citotóxico (viabilidade celular $\leq 70\%$). A análise estatística mostrou que os materiais dopados com cério HAp:Ce-2,50 e HAp:Ce-5,00 apresentaram níveis de viabilidade celular, respectivamente $95,4 \pm 1,8$ e $99,1 \pm 3,2$ %, similares ao grupo controle negativo (100%) e significativamente ($p \leq 0,05$) maior que a HAp pura ($89,4 \pm 1,0$). Portanto, os pós sintetizados não interferiram na atividade metabólica celular e, conseqüentemente, na viabilidade celular. Em outras palavras, os materiais não são citotóxicos e podem ser considerados citocompatíveis. Para este ensaio, a amostra HAp:Ce-1,75 não teve sua citotoxicidade estudada, pois, para os autores, seus resultados de atividade antimicrobiana não foram satisfatórios.

O resultado obtido pelo teste de citocompatibilidade confirma que a HAp dopada com Ce (2,50% e 5,00%) é um biomaterial viável para reparo tecidual. As amostras dopadas com Ce^{3+} mostradas na Figura 9 apresentaram o mesmo padrão de viabilidade celular do que o grupo controle negativo. Este resultado é semelhante ao encontrado na literatura [42] para hidroxiapatita dopada com cério para testes *in vitro* de viabilidade celular.

A hidroxiapatita é amplamente utilizada na regeneração de tecidos e aplicações biomédicas na forma de revestimentos em implantes metálicos, produção de enxertos de tecido ósseo e nervoso, agentes de liberação de fármacos, proteção de feridas, substratos de cultura celular, imobilização enzimática, próteses ósseas e enxertos devido à sua excelente biocompatibilidade, propriedade de osteocondução e similaridade com os componentes inorgânicos do osso natural [5,41,42]. Neste estudo foi possível observar que, por meio da dopagem com o íon Ca^{3+} , as propriedades antibacterianas e os efeitos não tóxicos esperados apareceram satisfatoriamente. Observamos que a incorporação do íon Ce^{3+} proporcionou uma melhora nos aspectos estudados do material. Assim, os materiais sintetizados demonstraram um grande potencial a ser utilizado em futuras aplicações no reparo ósseo e testes *in vivo* serão realizados para avaliar este potencial.

Figura 9 - Ensaio de citocompatibilidade *in vitro* de HAp, HAp:Ce-2,50 e HAp:Ce 5.00 realizado com linhagem de células de fibroblastos humanos (GM07492). Os resultados são expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle negativo (DMEM + 10% FBS). Grupo controle positivo como referência de efeito citotóxico (DMEM + 10% FBS + 30% DMSO). Análise estatística: ANOVA ONE WAY e o teste post hoc da FISHER. * $p \leq 0,05$.



4. Conclusão

O estudo da incorporação do íon Ce^{3+} na estrutura da matriz de HAp indicou propriedades antibacterianas e de citocompatibilidade satisfatórias. A caracterização dos materiais com DRX, FTIR, TG, MEV, EDS e XPS confirmaram a síntese de HAp e a incorporação de Ce^{3+} no material. A incorporação do Ce^{3+} não alterou a estrutura da HAp e os resultados semi-quantitativos da EDS mostraram que a relação Ca/P variou de 1,46 a 1,51. Testes antibacterianos diretos contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* mostraram a eficácia dos materiais sintetizados. O ensaio *in vitro* mostrou que os materiais são não citotóxicos. Assim, a presença do íon Ce^{3+} melhorou a atividade bacteriana inibitória e melhorou significativamente os resultados de citocompatibilidade do material.

5. Referências

- [1] Best, SM.; Porter, AE.; Thian, ES.; Huang, J. Bioceramics: past, present and for the future, *Journal of the European Ceramic Society*. 28 (2008) 1319–1327.
- [2] Dorozhkin, SV. Bioceramics of calcium orthophosphates, *Biomaterials*. 31 (2010) 1465–1485.
- [3] Kawabata, K.; Yamamoto, T.; Kitada, A. Substitution mechanism of Zn ions in β -tricalcium phosphate, *Physica B*. (2011) 890–894.
- [4] Xing, R.; Leng, Y.; Chen, J.; Q. Zhang, Q. A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo, *Biomaterials*. 26 (2005) 6477–6486.
- [5] Supová, M.; Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceramics Int*. 41 (2015) 9203–9231.
- [6] Dorozhkin, SV.; Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials*. 2 (2009) 399–498.
- [7] Omelon, SJ.; Grynopas, MD. Relationships between polyphosphate chemistry, biochemistry and apatite biomineralization. *Chemical Reviews*. 108 (2008) 4694–4715.
- [8] Vallet-Regi, M.; Navarrete, DAA. *Biomimetic Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications*, RSC Nanoscience & Nanotechnology, 2008, pp. 1–24.
- [9] Namba, RS; Inacio, MC.; Paxton, EA. Risk factors associated with deep surgical site infections after primary total knee arthroplasty: an analysis of 56,216 knees, *Bone Joint Journal*. 97 (2013), 775–782.
- [10] S. Nagano, S.; M. Yokouchi, M.; Setoguchi, T.; H. Sasaki, H.; H. Shimada, H. I. Kawamura, I.; Y. Ishidou, Y.; J. Kamizono, J.; Yamamoto, T.; H. Kawamura, H.; S. Komiya, S. Analysis of surgical site infection after musculoskeletal tumor surgery: risk assessment using a new scoring system, *Sarcoma*. 2014 (2014) 1–9.
- [11] Radovanovic, Z.; Jokic, B.; Velijovic, D.; Dimitrijevic, VK.; Petrovic, R.; Janackovic, D. Antimicrobial activity and biocompatibility of Ag^+ - and Cu^{2+} -doped biphasic hydroxyapatite/ α -tricalcium phosphate obtained from hydrothermally synthesized Ag^+ - and Cu^{2+} -doped hydroxyapatite, *Applied Surface Science*. 307 (2014) 513–519.
- [12] Kolmas, J.; Groszyk, E.; Kwiatkowska-Rózycka, D. Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties, *BioMed Research International*. 2014 (2014) 1–15.
- [13] Mishra, V.K.; Bhattacharjee, BN.; Parkash, O.; Kumar, D.; Rai, S.B. Mg-doped hydroxyapatite nanoplates for biomedical applications: A surfactant assisted microwave synthesis and spectroscopic investigations, *Journal of Alloys and Compounds*. 614 (2014) 283–288.
- [14] Ferraris, S.; Venturello, A.; Miola, M.; Cochis, A.; Rimondini, L.; Spriano, S.; Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration, *Applied Surface Science*. 311 (2014) 279–291.
- [15] Morais, D.S.; Fernandes, S.; Gomes, P.S.; Fernandes, M.H.; Sampaio, P.; Ferraz, M.P.; Santos, J.D.; Lopes, M.A.; Hussain, N.S. Novel cerium doped glass-reinforced hydroxyapatite with antibacterial and osteoconductive properties for bone tissue regeneration, *Biomedical Materials*. 10 (2015), 1–15.
- [16] Kanhed, S.; Awasthi, S.; Goel, S.; Pandey, A.; Sharma, R.; Upadhyaya, A.; Balani, K. Porosity distribution affecting mechanical and biological behaviour of hydroxyapatite bioceramic composites, *Ceramics International*. 43 (2017) 10442–10449.
- [17] Aina, V.; Lusvardi, G.; Annaz, B.; Gibson, IR.; Imrie, F.E.; Malavasi, G.; Menabue, L.; Cerrato, G.; Martra, G. Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effect of doped ions on the structure and chemico-physical properties, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 23 (2012) 2867–2879.

- [18] Kannan, S.; Goetz-Neunhoeffler, F.; Neubauer, J.; Ferreira, JMF. Ionic substitutions in biphasic hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate mixtures: structural analysis by Rietveld refinement, *Journal of the American Ceramic Society*. 91 (2008) 1–12.
- [19] Yu, J.; Chu, X.; Cai, Y.; Tong, P.; Yao, J. Preparation and characterization of antimicrobial nano-hydroxyapatite composites, *Mater. Sci. Eng. C*. 37 (2014) 54–59.
- [20] Shepherd, JH.; Shepherd, DV.; Best, SM. Substituted hydroxyapatites for bone repair, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. 23 (2012) 2335–2340.
- [21] Noor, Z. Nanohydroxyapatite application to osteoporosis management, *Journal. Osteoporosis*. 2013 (2013) 1-6.
- [22] Unabia, R.; Piagola, J.C; Guerrero, JR.; Vequizo, R.; Gambe, J., Odarve, MK.; Sambo, BR. Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate using $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, *Physica Status Solidi C*, 12 (2015) 572-575.
- [23] Othmani, M.; Aissa, A.; Grelard, A.; Das, RK.; Oda, R.; Debbabi, M. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-based nanocomposites by the functionalization of hydroxyapatite nanoparticles with phosphonic acids, *Colloids Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects*. 508 (2016) 336–344.
- [24] Zheng, L.; Zhu, J. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydrate. Polymers*. 54, (2003) 527–530.
- [25] Kaygili, O.; Dorozhkin, SV.; Keser, S. Synthesis and characterization of Ce-substituted hydroxyapatite by sol–gel method, *Materials Science and Engineering. C*. 42 (2014) 78–82.
- [26] Vieira, EG.; Sousa, PAA.; Matos, JME.; Santos, MRMC. Síntese pelo método da coprecipitação e caracterização estrutural do tungstato de cálcio com estrutura tipo scheelita. *Cerâmica*, v. 59, n. 351, (2013) p. 417-425.
- [27] Cavalcante, LS. Longo, VM.; Sczancoski, JC.; Almeida, MAP.; Batista, AA.; Varela, JA.; Orlandi, MO.; Longo, E.; Siu Li, M. Electronic structure, growth mechanism and photoluminescence of CaWO_4 crystals. *Cryst EngComm*, v. 14, (2012) p. 853-868.
- [28] Agrawal, K.; Singh, G.; Puri, D.; Prakash, S. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Powder by Sol-Gel Method for Biomedical Application, *Journal of Minerals and Materials. Characterization and Engineering*. 10 (2011) 727–734.
- [29] Gopi, D.; Ramya, S.; Rajeswari, D.; Karthikeyan, P.; Kavitha, L. Strontium, cerium co-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, characterization, antibacterial activity towards prokaryotic strains and in vitro studies, *Colloids Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects*. 451 (2014) 172–180.
- [30] Sun, LJ.; Gou, DG.; Zhao, WA.; Wang, LY.; Xu, KW. Influences of Reaction Parameters and Ce Contents on Structure and Properties of Nano-scale Ce-HA Powders, *Journal of Materials. Science & Technology*. 30 (2014) 776–781.
- [31] Duarte, LC.; Juchem, PL; Pulz, GM.; Brum, TMM.; Chodur, N.; Liccardo, A.; Fischer, AC.; Acauan, RB. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema 76 de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros, *Pesquisas em Geociências*. 30 (2013) 3–15.
- [32] Farokhi, M.; Mottaghitalab, F.; Samani, S.; Shokrgozar, M.A.; Kundu. S.C.; Reis, R.L.; Fatahi, Y.; Kaplan, D.L. Silk Fibroin/Hydroxyapatite Composites For Bone Tissue Engineering. *Biotechnology Advances*, V. 36, P. 68-91, 2018.
- [33] Liao, CS.; Lin, FH.; Chen, KS.; Sun, JS. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere, *Biomaterials*. 20 (1999) 1807–1813.
- [34] Adolfsson, E.; Nygren, M.; Hermansson, L. Decomposition Mechanisms in Aluminum Oxide–Apatite Systems, *J. Am. Ceram. Soc*. 82 (1999) 2909–2912.
- [35] Katsikogianni, M.; Missirlis, YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interaction, *European Cells & Materials*. 8 (2004) 37-57.

- [36] Murugan, R.; Vijayaprasath, G.; Ravi, G. The influence of substrate temperature on the optical and micro structural properties of cerium oxide thin films deposited by RF sputtering. *Superlattices and Microstructures*, v. 85, p. 321–330, 2015.
- [37] Ciobanu, CS.; Andronescu, E.; Prodan, AM.; Pall, L.; Costescu, A.; Le Coustumer, P.; Huneau, F.; Marutescu, L.; Ene, N.; Trusca, R.; Barna, ES.; Iconaru, SL. Physicochemical and antibacterial studies on silver doped nanohydroxyapatite, *Journal of Optoelectronics and Advanced. Materials*. 15 (2013) 918–922.
- [38] Díaz-Visurraga, J.; Gutierrez, C.; Plessing, VC.A. García, Metal nanostructures as antibacterial agents. In: Mendez-Vilas A, editor. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz, Spain: Formatex, 2011, pp. 210-218.
- [39] Babenko, LP.; Zholobak, NM.; Shcherbakov, AB.; Voychuk, SI.; Lazarenko, LM.; Spivak, MY. Antibacterial activity of cerium colloids against opportunistic microorganisms *in vitro*, *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 74 (2012) 54–62.
- [40] Ouyang, Y.; Xiu, Y.; Tan, S.; Shi, Q.; Chen, Y. Structure and antibacterial activity of Ce³⁺ exchanged montmoillonites, *Journal of Rare Earths*. 27, (2009) 858–863.
- [41] Trampuz, A.; Zimmerli, Diagnosis, W. and treatment of infections associated with fracture-fixation devices, *International Journal of the Care Injured*. 37 (2006) S59–S66.
- [42] Priyadarshini, B.; Anjaneyulu, U.; Vijayalakshmi, U. Preparation and characterization of sol-gel derived Ce⁴⁺ doped hydroxyapatite and its *in vitro* biological evaluations for orthopedic applications, *Mater. Des.* 119(2017) 446–455.
- [43] Lin, K.; Wu, C.; Chang, J. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape, *Acta Biomaterialia*. 10 (2014) 4071–4102.
- [44] Sadat-Shojai, M.; Khorasani, M.; Dinpanah-Khoshdargi, E.; Jamshidi, A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*. 9 (2013) 7591–7621.

CAPÍTULO 3: Artigo científico

Estudos das propriedades biológicas da hidroxiapatita dopada com Ga³⁺ para aplicações em reparação tecidual óssea

Marcos Pereira da Silva^a, Ewerton Gomes Vieira^a, Thalles Moura Fé Marques^b, Ana Cristina Vasconcelos Fialho^c, Edson Cavalcanti da Silva Filho^a

^aLaboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina-PI, Brasil

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus São João do Piauí, 64760-000, São João do Piauí, Brasil

^cDepartamento de Patologia e Clínica Odontológica, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina-PI, Brasil

Resumo

Vários são os materiais aplicados em defeitos ósseos, no entanto, a hidroxiapatita (HAp) por ser um material com propriedades similares ao tecido ósseo tem tido destaque, porém, tal aplicação pode ser ainda melhorada com a incorporação de íons metálicos, tais como o íon Ga^{3+} . Portanto, o presente trabalho tem como escopo sintetizar a hidroxiapatita dopada com íons gálio em diferentes proporções e avaliar sua atividade antibacteriana, bem como, sua citotoxicidade. Deste modo, a síntese de HAp e hidroxiapatita dopada com 2,50% (HAp-Ga-2,50%) e 5,00% (HAp-Ga-5,00%) de íons gálio ocorreu pelo método da precipitação. As amostras foram caracterizadas por espectroscopia Raman e FTIR que revelaram a presença de modos vibracionais característicos de grupos fosfatos pertencentes da fase hidroxiapatita. Por meio DRX, verificou-se que os planos cristalográficos obtidos sugerem a constituição da fase hidroxiapatita, para todas as amostras sintetizadas. A análise térmica (TG) indica uma menor perda de massa nas amostras dopadas com íons gálio. Somando ao já descrito, a técnica de MEV-EDS, apresentaram que os materiais possuem morfologia em formato de aglomerados de partículas, não uniformes, e o EDS identificou a presença de cálcio e o fósforo em todos os materiais e de gálio para os materiais dopados. Portanto, as sínteses ocorrem com sucesso. A atividade antibacteriana ocorreu por meio teste de contato direto. Sendo assim, as bactérias testadas foram a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, e o material que apresentou melhor desempenho na inibição foi a hidroxiapatita dopada com 5% de gálio. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MMT e todos os materiais não apresentaram toxicidade. Diante disso, pode ser um promissor na engenharia tecidual.

Palavras-Chave: Hidroxiapatita, gálio, atividade antibacteriana, citotoxicidade.

Abstract

Several devices are applied in bone defects, however, hydroxyapatite (HAp) being a material with properties similar to the prominent bone tissue, however, such application can be further improved with an incorporation of metallic ions, such as the Ga³⁺ ion. Therefore, the present work aims to synthesize a hydroxyapatite doped with gallium in different proportions and to evaluate its antibacterial activity, as well as its cytotoxicity. Thus, a synthesis of HAp and hydroxyapatite doped with 2.5% (HAp-Ga-2.5%) and 5.0% (HAp-Ga-5%) gallium was produced by the co-precipitation method. The samples were characterized by Raman spectroscopy, FTIR, which revealed a characteristic vibrational presence of phosphate groups belonging to the hydroxyapatite phase. By means of DRX, it was verified that the crystalline water planes were submitted to a phase of hydroxyapatite, for all the samples synthesized. A thermal analysis (TG) indicates a lower mass loss in gallium-doped samples. This is a method of morphed in particulate of molecular, in uniformized, and the EDS identified the presence of calcium and phosphorous in materials the materials and materials to materials doped. Therefore, the syntheses occur successfully. The antibacterial activity appeared through the direct contact test. Thus, as the bacteria tested were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922, the material that gave the best inhibition performance was a hydroxyapatite with 5% gallium. Cytotoxicity was assessed by the MMT assay and all materials are non-toxic. Given this, it may be a promising tissue engineering.

Keywords: Hydroxyapatite, gallium, antibacterial activity, Cytotoxicity.

1. Introdução

O ser humano geralmente padece por vários problemas de saúde, dentre eles, a perda óssea, sendo que, as suas causas as quais promovem isso são diversificadas, tais como, fraturas, desgaste do próprio tecido calcificado, dentre outras. Em virtude disso, propostas são apresentadas para amenizar e/ou cessar o problema referente a substituição ou regeneração óssea. Assim, a reparação de tecidos ósseos pela hidroxiapatita é de grande importância, tendo em vista que possui elevada similaridade com os constituintes inorgânicos dos tecidos calcificados [1]. Além de possuir potencialidade de osteocondução, osteoindução e biocompatibilidade [2-6].

Entretanto, esse tipo de material no ato da reparação óssea pode ter sua função mitigada pela inibição de bactérias [7]. Diante disso, convencionalmente tal problema supramencionado era tratado com antibióticos, porém, bactérias tornam-se resistentes a tal tratamento [7-9]. Deste modo, são necessárias outras formas de inibição da proliferação de bactérias qual seja incorporações de metais com atividade antibacteriana, bem como, modificações na superfície com outros materiais para impedir a adesão bacteriana [10,11].

Nesse contexto, é característico da hidroxiapatita permitir a substituição de íons, assim, os locais dos cátions de cálcio podem ser trocados com íons como cério (Ce^{3+}) [12], gálio (Ga^{3+}) [13], selênio (SeO_3^{2-}) [14], titânio (Ti^{4+}) [15], estrôncio (Sr^{2+}) [16], prata (Ag^+) [17], cobre (Cu^{2+}) [18] e zinco (Zn^{2+}), dentre outros [19].

Salienta-se também, que a hidroxiapatita dopada com íons é considerada um biomaterial promissor em aplicações de regenerações ósseas, uma vez que quantidades mínimas de íons podem promover modificações que resultam em vantagens e melhoram aspectos biológicos, físico-químicos, mecânicos e antimicrobianos [19-21].

Acredita-se que a inserção do Ga^{3+} junto aos biomateriais podem levar a melhorias adicionais das suas propriedades, uma vez, que as suas aplicações médicas em estudos *in vivo*, potencializam efeitos anti-inflamatórios e causam uma aceleração anabólica óssea, além de atuar bloqueando a atividade dos osteoclastos sem afetar a viabilidade dessas células [22-23].

O Ga^{3+} é de grande interesse do ponto de vista biológico por ser análogo ao Fe^{3+} devido a similaridades químicas, tais quais, raios iônicos, eletronegatividade, afinidade eletrônica, número de coordenação [24]. Consequentemente, pode ser substituído um pelo outro, tanto em estado sólido quanto em solução [25,26].

Embora os compostos de gálio tenham mostrado alta biodisponibilidade [21] devido à sua capacidade de imitar íons férricos (Fe^{3+}), os íons de gálio (Ga^{3+}) são antiproliferativos para células que proliferam patologicamente, particularmente células cancerosas e algumas bactérias [27]. No entanto, as propriedades antibacterianas de tal material ainda não foram examinadas; por exemplo, as espécies de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, são agentes comuns e causadores de infecções ósseas, com uma forte resistência aos tratamentos convencionais utilizando antibióticos [28,29].

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo sintetizar a hidroxiapatita dopado com íons gálio em diferentes proporções e avaliar a sua ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além de investigar sua biocompatibilidade pelo estudo da citotoxicidade *in vitro*.

2. Parte Experimental

2.1. Materiais e Reagentes

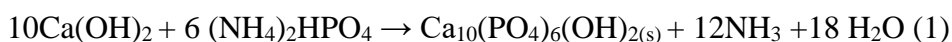
Para a realização da síntese da hidroxiapatita foram utilizados, hidróxido de cálcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Vetec), fosfato de amônio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Neon), nitrato de gálio (III) hidratado (Sigma-Aldrich). Todos os produtos químicos foram utilizados sem mais processos de purificação. Utilizou-se água deionizada para preparar todas as soluções.

Os testes antibacterianos foram utilizados as espécies *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Para os experimentos de viabilidade celular, utilizou linhagem celular GM07492 (fibroblasto humano), células/poço: 1×10^5 , meio de cultura DMEM (Gibco/Thermofisher), suplementado com soro bovino fetal (SBF) (nutricell), penicilina e estreptomicina 10U/mL (sigma).

2.2. Síntese da Hidroxiapatita

A síntese da hidroxiapatita (HAp) ocorreu pelo do método de precipitação. O procedimento de síntese consistiu na dissolução, em água deionizada, das massas dos reagentes precursores de cálcio (Ca^{2+}) e de fosfato (PO_4^{2-}) para obedecer a razão Ca/P = 1,67 característica da HAp. Após as dissoluções, as soluções foram misturadas em tubos tipo falcon sob agitação vortex, e colocadas sob agitação magnética em um béquer. O tempo reacional foi de aproximadamente 3h à temperatura de 25 ± 2 °C. Após a síntese, o material foi lavado, centrifugado (4000 rpm por 4 minutos) e seco em estufa na temperatura de 110 °C, por 16 h. Então, o pó obtido foi macerado com auxílio do almofariz e pistilo e

em seguida, peneirado com peneira de malha 35 VT e abertura de 425 μm . A Equação 1 mostra a reação química para a síntese da HAp [30].



2.3. Síntese da Hidroxiapatita dopada com Ga^{3+}

Para a síntese da Hidroxiapatita dopada com 2,5 % e 5,0 % de Ga^{3+} , utilizou o método de precipitação. Sendo que ocorreu a adição simultânea das soluções aquosas do fosfato de amônio dibásico, hidróxido de cálcio e do nitrato de gálio, na temperatura ambiente, por 3h, em pH básico (10-11). Após o término do processamento, as soluções foram centrifugadas, lavadas com água deionizada e o produto seco em estufa a 110 $^\circ\text{C}$ por 16 h. Por fim, o pó branco obtido foi macerado com auxílio do almofariz e pistilo e em seguida, peneirado com peneira de malha 35 VT e abertura de 425 μm .

2.4. Caracterizações

2.4.1 Difratomia de Raios X (DRX)

Os materiais sintetizados foram caracterizados pela técnica de difração de raios (DRX). Foi utilizado o equipamento LABX – XDR 600, Shimadzu, $\text{Cu} - \text{K}\alpha$ ($\lambda = 1,5406\text{\AA}$) com 2θ no intervalo de 10° a 60° , com taxa de varredura de 2°min^{-1} com tempo de exposição de 40 minutos. O tamanho médio de partícula é calculado a partir de dados DRX usando a aproximação Debye-Scherrer (Eq. 2):

$$\tau = \frac{k\lambda}{B_\tau \cos\theta} \quad (2)$$

onde τ é o tamanho de partícula em nanômetro, conforme calculado para a reflexão hkl , λ é o comprimento de onda da radiação $\text{Cu}_{\text{K}\alpha 1}$ (1,5406 \AA), B_τ é a largura a meia altura para o pico de difração em consideração (em radiano), θ é o ângulo de difração e k é a constante de ampliação escolhida como 0,9.

O índice de cristalinidade ($\text{CI}_{\text{raio-X}}$) foi calculado de acordo com Person et al. (1996), que se baseia no grau de resolução das quatro reflexões de raios-X entre 2,85 e 2,60 \AA . A altura é medida entre o valor na parte superior de um pico e o valor do mínimo que o separa do pico a seguir. Valores precisos das intensidades superior e mínima são obtidos após a deconvolução dos espectros usando rotinas padrão e perfis de tipo Voigt foi utilizado o programa PeakFit. Estes valores divididos pela intensidade líquida do pico mais alto obtém o valor do raio $\text{CI}_{\text{raio-X}}$ da seguinte maneira, de acordo com a Eq. 3:

$$CI_{\text{raio-X}} = (H[202] + H[300] + H[112]) / H[211] \quad (3)$$

onde H[202], H[300], H[112] e H[211] são as alturas dos picos correspondentes às reflexões (202), (300), (112) e (211), respectivamente [31].

2.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier foi realizada em um Espectromômetro FTIR modelo Vertex 70 do fabricante Bruker Optics com 64 scans para cada pastilha preparada das amostras com KBr, na região de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . As amostras de HAp foram maceradas em um almofariz de ágata. A água adsorvida foi removida das amostras após 24 h de aquecimento a 100 °C. Quantidades de pós de aproximadamente 1 mg foram misturados com 100 mg de KBr. Esta mistura foi então pressionada sob carga de 07 toneladas em uma pastilha de tamanho de pastilhas de 1 mm. O Índice de Cristalinidade (CI_{FTIR}) foi calculado seguindo o método descrito em Shemesh (1990):

$$CI_{\text{FTIR}} = (A_{605} + A_{565}) / A_{590} \quad (4)$$

onde A_x é a absorvância no número de onda x , assumindo uma linha de base direta entre 750 e 450 cm^{-1} [32].

2.4.3. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram realizados em um espectrômetro Raman confocal, Bruker Senterra, com um objetivo de 50x e laser de 785 nm como fonte de excitação. A baixa densidade de potência do laser foi utilizada para evitar o superaquecimento da amostra. Foi utilizada uma resolução espectral de 3 cm^{-1} e o intervalo utilizado foi de 80-1050 cm^{-1} . Além disso, a espectroscopia Raman foi realizada usando um espectrômetro micro-Raman confocal Renishaw inVia na faixa de número de ondas (100-1500 cm^{-1}) com uma objetiva 100x de microscópio confocal e laser de 514 nm como fonte de excitação; a resolução espectral foi de 2 cm^{-1} .

O índice de cristalinidade é quantificado utilizando o pico mais intenso (963 cm^{-1}) correspondente à vibração de estiramento simétrica do grupo PO_4^{3-} , a partir do qual dois parâmetros podem ser caracterizados: a frequência ν e a largura total à meia altura (FWHM), Γ . Estes dois parâmetros (Γ e ν) foram obtidos por decomposição dos espectros no 800-1100 cm^{-1} , usando padrão e perfis de tipo Voigt ou Pearson para os picos Raman. O índice de cristalinidade foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{CIRaman} = 4,9/\Gamma \quad (5)$$

o valor de $4,9 \text{ cm}^{-1}$ corresponde à média do FWHM da apatita magmática padrão [33].

2.4.4 Análise termogravimétrica (TG)

A análises foram realizadas no aparelho SDT Q600 V20.9 Build 20 da TA Instruments utilizando aproximadamente 5 mg de amostras com razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de Argônio com fluxo de $100,0 \text{ mL min}^{-1}$, em porta amostra de alumina na faixa de temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

As micrografias das amostras foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) com canhão a emissão por campo, marca FEI, modelo Quanta FEG 250, com tensão de aceleração de 1 a 30 kV, equipado com EDS de SDD (Silicon drift detectors), marca Ametek, modelo HX-1001, detector Apollo X-SDD. As condições - energia, spot, magnificação - estão registradas na parte inferior de cada foto, como escala e magnificação (Notação: SE - detector de elétrons secundários ETD-SE; BE - detector de elétrons retroespalhados vCD). Amostras foram fixadas em fita adesiva dupla face de carbono e recobertas com Au na metalizadora, marca Quorum, modelo Q150R, durante 30s, a 20 mA, por plasma gerado em atmosfera de argônio. Em relação à microanálise por EDS, os espectros das amostras foram coletados a 25 kV e spot 5.

2.5. Teste Antibacteriano

2.5.1 Cepas Bacterianas

Utilizaram-se as linhagens de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), microrganismos do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da UFPI (LPM).

2.5.2 Preparo do Inóculo

A princípio realizaram culturas de bactérias mantidas sob as condições de ágar nutriente a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, transferiu-se uma colônia bacteriana para um tubo falcon contendo 3,0 mL do meio Brain Heart Infusion Broth a 3% (BHI), seguido de incubação a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24h. Em seguida, desta cultura em BHI ocorreu o preparo de uma suspensão bacteriana padronizada para uma densidade equivalente a 0,5 na escala Mac Farland, aproximadamente $1,5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ (Unidades Formadoras de Colônias - UFC). Assim,

efetuou-se, à diluição desta suspensão a $1,5 \times 10^4$ UFC/mL para *S. aureus* e *E.coli* em salina fisiológica.

2.5.3 Teste do Contato Direto

O teste de atividade antibacteriana foi realizado por meio do contato direto, conforme a metodologia de Zheng *et. al.*, (2003) [34]. Deste modo, obtendo o resultado da contagem de unidade formadora de colônias (UFC). Durante a execução do teste a suspensão bacteriana padronizada foram submetidas a diluições seriada tendo como limite a obtenção da diluição 10^{-4} ($1,5 \times 10^4$ UFC/mL). Posteriormente, 2000 μ L desta suspensão diluída foram transferidas para um tubo tipo falcon esterilizado, ao qual foi adicionado 2000 μ g do material. Portanto, para determinação do efeito inibitório, 100 μ L desta suspensão foram transferidos para placas de Petri contendo o meio ágar Blood Agar Base (Columbia) e semeadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky pelo método *spread plate*. As placas foram incubadas na estufa microbiológica por 24h a 37 °C, em seguida foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). O experimento realizou-se em triplicata para cada uma das concentrações testadas. Para o controle positivo os produtos foram substituídos por uma solução salina (2000 μ L) para posterior comparação com as soluções com os produtos testados.

A porcentagem do efeito inibitório produzido por cada solução-teste foi calculada conforme a equação aduzida a seguir:

$$\eta = \frac{N_1 - N_2}{N_1} \times 100\% \quad (6)$$

onde η é definido como o efeito inibitório, N_1 é a média aritmética das unidades formadoras de colônia das placas controle e N_2 é a média aritmética das unidades formadoras de colônia de cada uma das soluções testadas.

2.5.4 Ensaio de viabilidade celular (citocompatibilidade)

O ensaio de viabilidade celular *in vitro* foi realizado de acordo com procedimentos padrão (ISO10993-5: 2009). Tal procedimento foi por MTT brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], ensaio colorimétrico. As células (Fibroblasto humano GM07492) foram semeadas em placa de cultura de 96 poços, mantidas em meio de cultura, enriquecido com SBF e antibióticos, e encubadas em estufa 37 °C em atmosfera

umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Simultaneamente foram preparados os extratos das amostras, na concentração 20mg/mL, mantidos em estufa 37 °C, por 24 horas. Depois, foi realizada a substituição do meio DMEM pelo extrato, realizadas em triplicatas, e mantidas em condições de cultivo por 24 horas. Em seguida, os poços foram lavados com PBS (uma vez), e foram adicionados 50 µL de MTT. A placa de cultura foi novamente incubada em estufa 37 °C por 4 horas. Após incubação, 100 µL de isopropanol foram adicionados aos poços e homogeneizados delicadamente para a solubilização dos cristais de formazan. Os valores de densidade óptica (DO) obtidos em um comprimento de onda (λ) de 570 nm num espectrofotômetro foram convertidos em porcentagens de viabilidade. O valor de DO de cada amostra foi convertido em porcentagens de viabilidade celular em relação a um grupo controle negativo (DMEM + 10% FBS = 100% de viabilidade celular) e submetido a análise estatística (ANOVA-ONEWAY e FISHER'Spost hoc test) em nível de significância de 5%. Foi realizado um grupo controle positivo (referência ao efeito citotóxico) pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO 30% v / v) ao meio de cultura (DMEM + 10% FBS).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização dos materiais

3.1.1 Difratomia de Raios X (DRX)

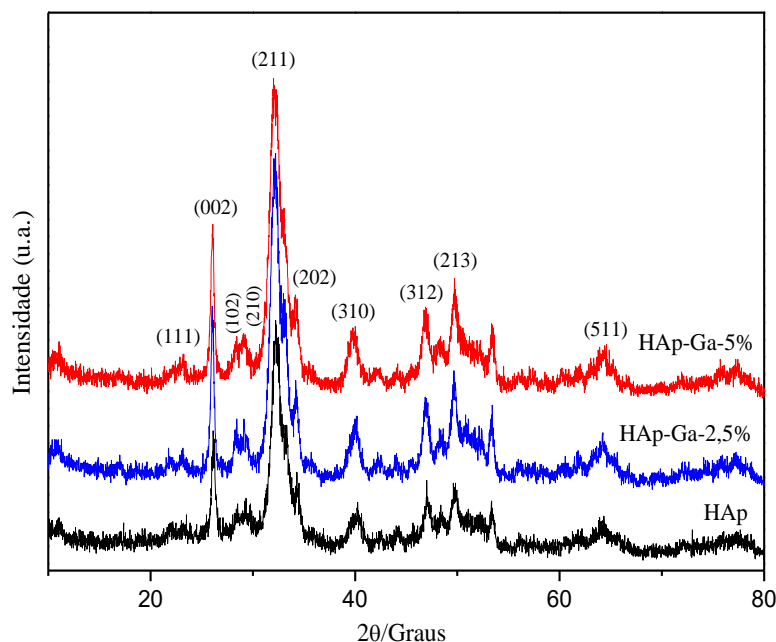
Os difratogramas da HAp pura e dopadas com diferentes proporções de Ga³⁺ são mostrados na Figura 1. Observamos que os planos específicos que caracterizam a fase cristalina da hidroxiapatita (111), (002), (102), (210), (211), (202), (310), (312), (213) e (511) estão em destaque e em anuência com a ficha catalográfica JCPDS 001-1008, deste modo, sugerindo que o material foi obtido com êxito [35].

Vale salientar, que embora modificada a hidroxiapatita com gálio nas proporções de 2,5 e 5,0 % ainda são mantidos os planos que indicam a formação da hidroxiapatita e consequentemente a não formação de fases secundárias. Além disso, na maior incorporação de íons de gálio, o plano proeminente (211) se ampliou devido ao estresse de rede de HAp. Além disso, o plano (202) foi ampliando à medida que aumenta a incorporação de íons de

gálio em comparação HAp. O tamanho médio de cristalito foi calculado usando *PikFit* (Análise de Material Usando Difração). O tamanho do cristalito de HAp, HAp-Ga-2,5% e HAp-Ga-5,0% foi de 11,20; 38,30 e 41,50 nm, respectivamente [36].

Figura 1- Padrão de difração de Raios-X das amostras HAp, HAp-Ga-2,5%,

HAp-Ga-5,0%.

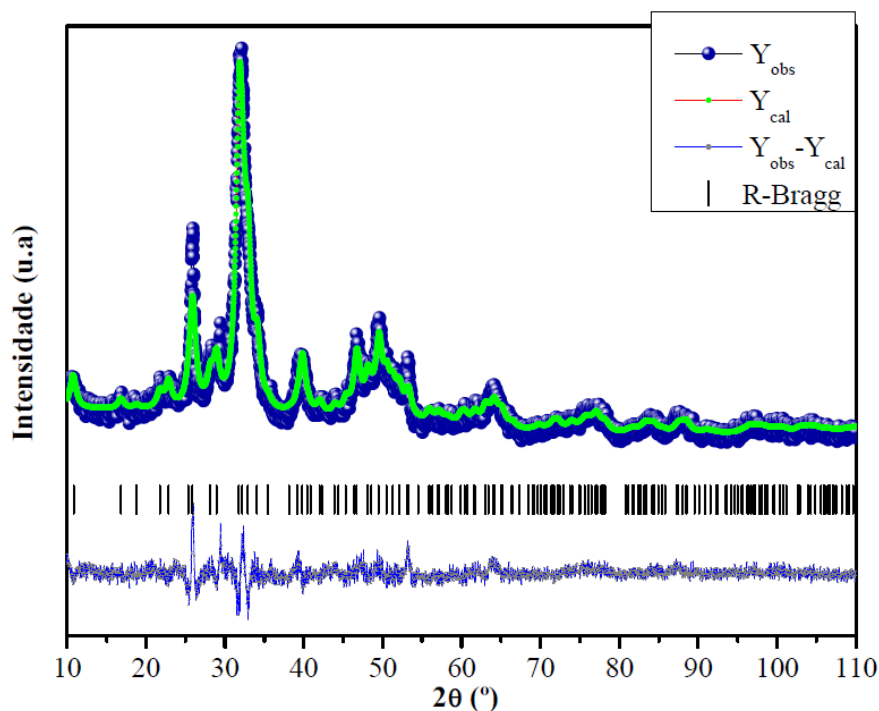


Existem duas formas possíveis de incorporação de metal trivalente na rede cristalina de hidroxiapatita: através da substituição heterovalente e através da intercalação, por exemplo, formando soluções sólidas de substituição/intercalação. Como a soma dos raios iônicos $\text{Ga}^{3+} + \text{NH}_4^+ = 2,69 \text{ \AA}$ excede o espaço disponível para $2\text{Ca}^{2+} = 1,98 \text{ \AA}$ e, ao mesmo tempo, os parâmetros da rede não aumentam, significa que quando se usa $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, o gálio forma solução sólida de intercalação e não a substituição. A intercalação pode explicar o aumento do tamanho do cristalito de HAp dopadas com gálio.

Para ser mais eficaz em relação a sugestão da incorporação de gálio na estrutura da hidroxiapatita e que não ocorre modificação na fase da hidroxiapatita. Foi realizada a identificação da composição das fases pelo refinamento de Rietveld usando o software GSAS EXPGUI 2012. Para a coleta de dados do refinamento a variação 2θ foi entre 10° a 110° , com taxa de varredura de 1° min^{-1} , tamanho de passo de $0,02^\circ$ e tempo de medição de 5s por passo. Os difratogramas obtidos foram comparados com perfis reportados na literatura e seus respectivos cartões da base de dados The International Centre for Diffraction Data (ICDD) e Inorganic Crystal Structure Database (ICSD).

Por meio do refinamento de Rietveld foi possível se ter uma estimativa da aproximação dos difratogramas do modelo estrutural em comparação com padrões disponibilizados no ICSD. A Figura 2 mostra um bom acordo entre os padrões de DRX observados e os resultados de ajuste teórico calculados para a HAp-Ga-5,00.

Figura 2 - Gráfico de refinamento pelo método Rietveld da hidroxiapatita incorporada com 5,0% de gálio.



Para esse refinamento o valor de χ^2 (fator de convergência ou Chi²) foi igual a 1,966. Esse outro parâmetro qualifica o refinamento como satisfatória, uma vez que o valor χ^2 calculado foi menor que dois ($\chi^2 < 2$) [37]. Para que os resultados obtidos com o refinamento sejam considerados aceitáveis, o Rwp deve possuir valores próximos a 10% para estruturas tetragonal, ortorrômbica, romboédrica ou hexagonal [38]. Os valores de Rwp para a amostra HAp-Ga foi de 11,00%.

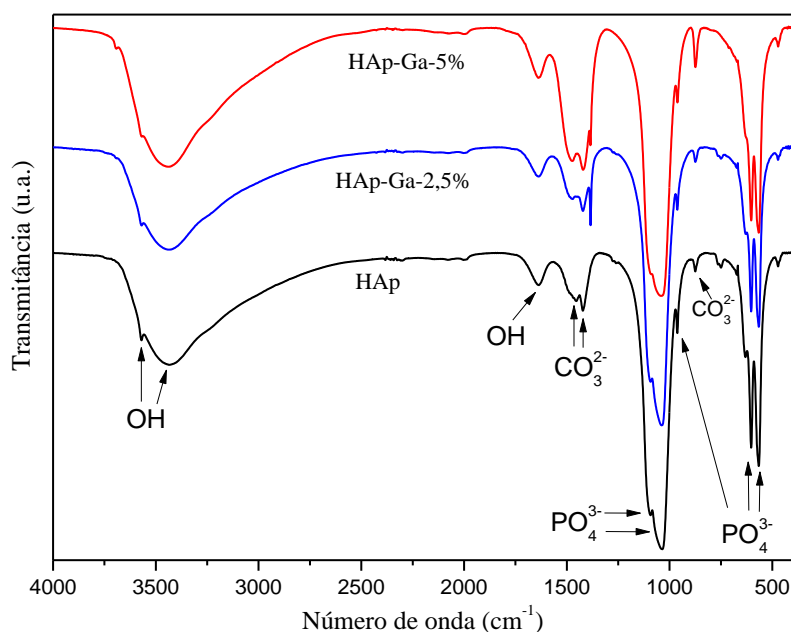
Foi possível detectar que os difratogramas das amostras sintetizadas tiveram similaridade com o cartão de número 26205 (ICSD), com estrutura do tipo hexagonal e grupo espacial P63/m. Seus parâmetros de célula unitária são: $a = b = 0,943$ nm e $c = 0,690$ nm e $V = 531,39$ Å³, os valores dos parâmetros da célula unitária para o cartão padrão nº 26205 são: $a = b = 0,942$ nm e $c = 0,688$ nm e $V = 529,09$ Å³. Observe que embora a quantidade de íon gálio não tenha sido suficiente para causar o surgimento de novos picos no DRX, uma variação, nos parâmetros de rede e no volume da célula unitária (cerca de 0,43%), quando comparados com os valores do cartão, ainda que discreto, sugerem que

houve alteração da rede cristalina, confirmando os resultados do DRX. Quando comparados com os calculados por Kebiroglu et al., 2017, esses parâmetros ($a = b = 0,941$ nm e $c = 0,689$ nm e $V = 572,10 \text{ \AA}^3$), também se aproximam [39].

3.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 3 são mostrados os espectros na região do infravermelho da HAp e da HAp dopada em diferentes concentrações de gálio, os espectros mostram vibrações típicas da fase HAp. Os espectros mostram as presenças dos modos vibracionais da HAp, a pequena banda em 3570 cm^{-1} é o modo de estiramento característico da hidroxila (O-H) da estrutura da hidroxiapatita. As bandas em 3444 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} indicam a presença de estiramento e deformação, respectivamente, do grupo hidroxila da água [40]. As bandas entre $1400\text{-}1500$ e em 875 cm^{-1} são referentes a vibrações de estiramento e flexão assimétricas de grupos CO_3^{2-} . Finalmente as bandas de $1000\text{-}1300$, 965 e 565 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento assimétrico, estiramento simétrico e vibrações de flexão assimétricas dos grupos PO_4^{3-} , respectivamente [41].

Figura 3 - Espectros FTIR dos materiais HAp, HAp-Ga-2,5% e HAp-Ga-5,00%.



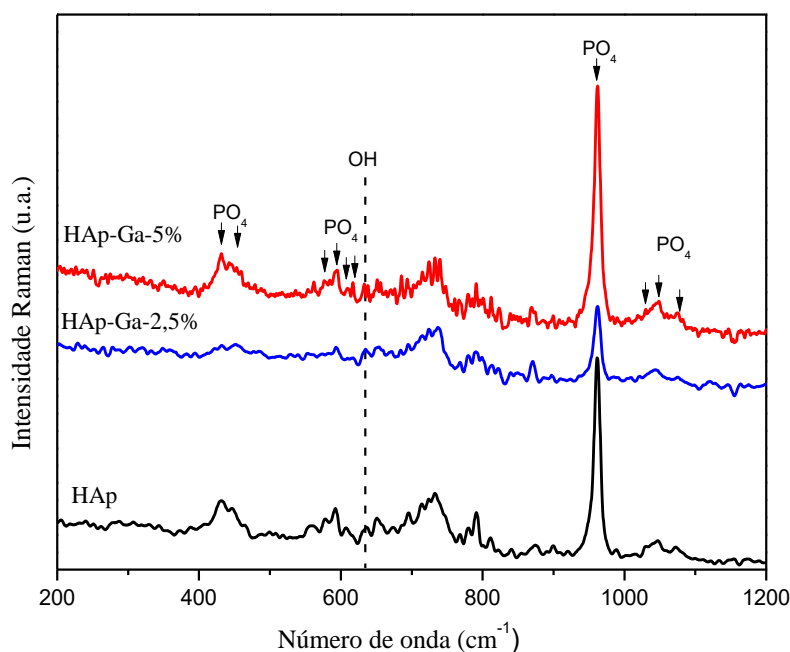
A comparação do espectro FTIR das amostras dopadas com íons gálio, mostra que a incorporação de Ga^{3+} levou a algumas mudanças no espectro FTIR das bandas HAp, CO_3^{2-} a 1462 , 1418 e 875 cm^{-1} aparecem com maior intensidade, principalmente no espectro da amostra HAp-Ga-5%, sugerindo que a um aumento de grupos carbonatos. Os espectros para as amostras dopadas com íons gálio não ocorreu mudanças relevantes nos

modos vibrações de HAp, possibilitando a indicação que embora modificada com metais os modos vibracionais da fase HAp permanece.

3.1.3 Raman

Os espectros Raman para HAp e HAp dopada com íons gálio em diferentes quantidades são mostrados na Figura 4. O espectro Raman de HAp possui um modo de estiramento característico de PO_4 ν_1 a 961 cm^{-1} , como pode ser visto na Figura 4, que é dominante nos espectros das amostras. Além deste modo, dois modos de $\nu_2(\text{PO}_4)$, quatro de $\nu_3(\text{PO}_4)$ e quatro modos de $\nu_4(\text{PO}_4)$ também foram resolvidos. Todas as bandas foram atribuídas a modos de vibração interna dos grupos fosfato. Os modos dos grupos hidroxila pertencentes a moléculas de água foram observados a 630 cm^{-1} . Pela, presente técnica não é possível identificar o íon gálio na estrutura da hidroxiapatita. No entanto, a técnica corrobora juntamente com o DRX e FTIR que o tamanho do cristal ocorre um aumento o que leva a sugerir eu o íon foi realmente incorporado na estrutura da hidroxiapatita.

Figura 4 - Espectroscopia Raman da HAp, HAp-Ga-2,5% e HAp-Ga-5,0%.



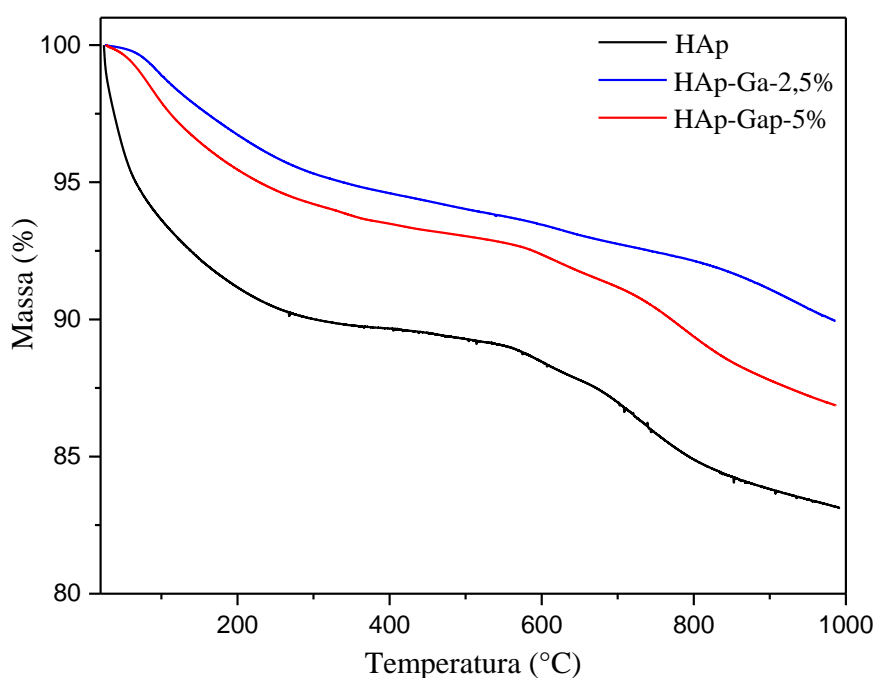
A análise espectral mostra a ausência de qualquer fase de cristal de fosfato de cálcio no material cristalizado diferente de HAp. E que a largura relativamente maior das bandas das amostras da primeira e segunda preparação é indicativa da existência de grupos de fosfato estruturalmente desordenados [42]. Isso, só reforça o que já foi citado sobre a sugestão da incorporação do íon metálico na estrutura do material.

Somado ao já descrito pelas técnicas de caracterizações mencionadas, ao calcular o índice de cristalinidade (IC) pelo DRX, obtemos o valor ($IC_{\text{raio-X}} = 3,23, 1,30$ e $0,57$ para HAp, HAp-Ga-2,5 e para a HAp-Ga-5,0. O IC calculados pelos espectros Raman (IC_{raman}) para as amostras HAp, HAp-Ga-2,5 e HAp-Ga-5,0 foram $0,56, 0,45$ e $0,43$ [43] e o índice de cristalinidade do FTIR (CI_{FTIR}) das amostras HAp, HAp-Ga-2,5 e HAp-Ga-5,0 foram $6,8, 1,6$ e $0,5$, respectivamente [44]. Os índices de cristalinidade são baixos para as amostras dopadas com gálio enquanto que os índices de cristalinidade da HAp são mais altos, indicando que diminui a cristalinidade após o processo de dopagem com íons Ga^{3+} . Isso, permite sugerir que o íon gálio de fato foi incorporado na estrutura da hidroxiapatita.

3.1.4 Análise termogravimétrica

Apartir das curvas TG verificou-se o comportamento térmico da HAp e dos materiais dopados frente ao aquecimento. A curva TG da HAp (Figura 5), mostra a diminuição de massa contínua até aproximadamente a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, evento esse conhecido como a liberação de água fisicamente adsorvida na superfície do material. Já a perda de massa no intervalo de temperatura de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $550\text{ }^{\circ}\text{C}$, refere-se a perda massa relacionada com remoção de água quimicamente adsorvida. No entanto, na faixa de temperatura entre $575\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$, valor da temperatura final do experimento, acredita-se que ocorreu a condensação de grupos hidroxilas presentes na superfície da HAp pura.

Figura 5- TG da HAp, HAp-Ga-2,5% e HAp-Ga-5%.



Os materiais dopados como pode ser observado na Figura 5 tem uma menor perda de massa percentual, essa peculiaridade da perda ainda não se sabe de modo claro a natureza e maneira da coordenação das interações da água segundo o Menilkov *et al* 2017 [39]. No entanto, é possível verificar que a incorporação do gálio na HAp aumenta sua estabilidade. Isso pode ser observado na curva que a Hidroxiapatita dopada, na temperatura de até 200 °C tiveram as perdas de massa em percentual de 5% já para HAp o primeiro evento ocorre em 400 °C com uma perda de massa no teor de aproximadamente 10%.

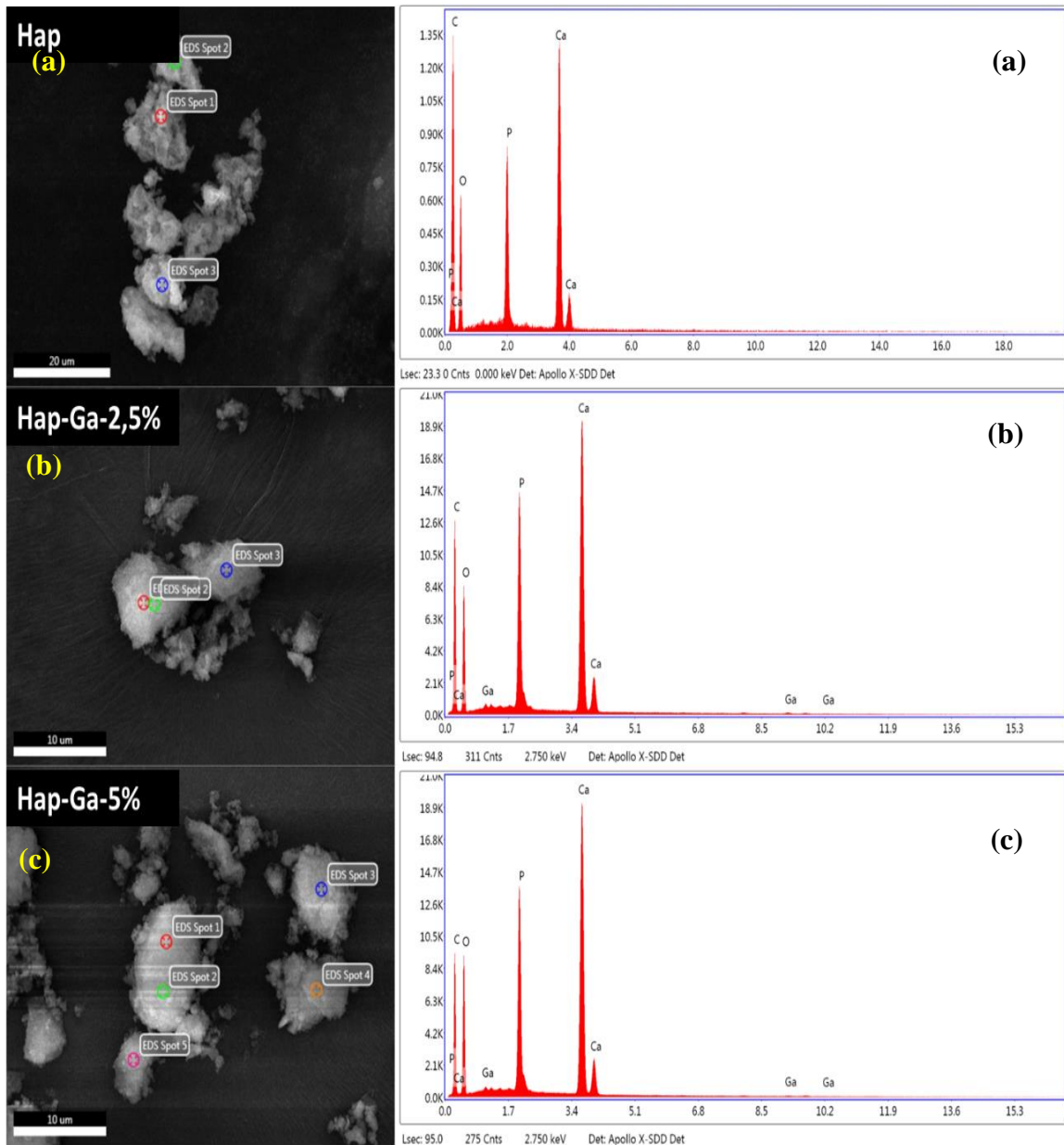
3.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A microscopia eletrônica de varredura foi empregada uma vez que essa técnica promove uma análise das morfologias das amostras, a Figura 6 apresenta a micrografia e os pontos onde foram realizadas as análises dos EDS das amostras HAp, HAp-Ga-2,5%, e HAp-Ga-5,0%. A micrografia para a amostra de HAp revelada na Figura 6 demonstra a morfologia na forma de aglomerados de partículas não uniformes e com superfície irregular. Igualmente, as amostras dopadas com gálio em diferentes proporções apresentam a formação de aglomerados de partículas não regulares.

No entanto, é possível inferir pela imagem que as superfícies dos materiais dopados tendem a ter uma organização com um aumento no tamanho dos aglomerados. Deste modo, somando as outras técnicas de caracterizações tal resultado dessa caracterização vem só a complementar que a síntese se procedeu adequadamente. E que, embora dopada ainda permanece as características morfológicas da HAp.

Diante disso, identificaram-se as presenças de cálcio, cério, fósforo e oxigênio nos materiais sintetizados, a presença de carbono deve-se ao grid de carbono que foi utilizado para realizar a caracterização, e a presença de carbonato observado no FTIR. Além disso, os EDS das amostras dopadas mostram a presença de gálio o que leva a confirmação da dopagem, ver Tabela 1. Portanto, não só identifica como ratifica a presença dos elementos característicos da HAp e dopada com gálio, assim, corroborando com os outros resultados.

Figura 6 – Imagens obtidas através do MEV das amostras (a) HAp, (b) HAp-Ga-2,5% e (c) HAp-Ga-5,0% e resultados do EDS das amostras (a) HAp, (b) HAp-Ga-2,5% e (c) HAp-Ga-5,0%.



A partir dos resultados da porcentagem atômica dos elementos presentes nas amostras HAp, HAp-Ga-2,5%, HAp-Ga-5,0%, foram calculada as seguintes razões: Ca/P 1,57; $(Ca+Ga)/P = 1,66$ e $(Ca+Ga)/P = 1,56$ para HAp, HAp-Ga-2,5%, HAp-Ga-5%, respectivamente, apresentadas na Tabela 1. Esses resultados comprovam que ocorreu a formação de hidroxiapatita com uma razão Ca/P satisfatória.

Tabela 1 - Percentagem atômica semi-quantitativa de HAp e HAp contendo com Ga obtida por EDS.

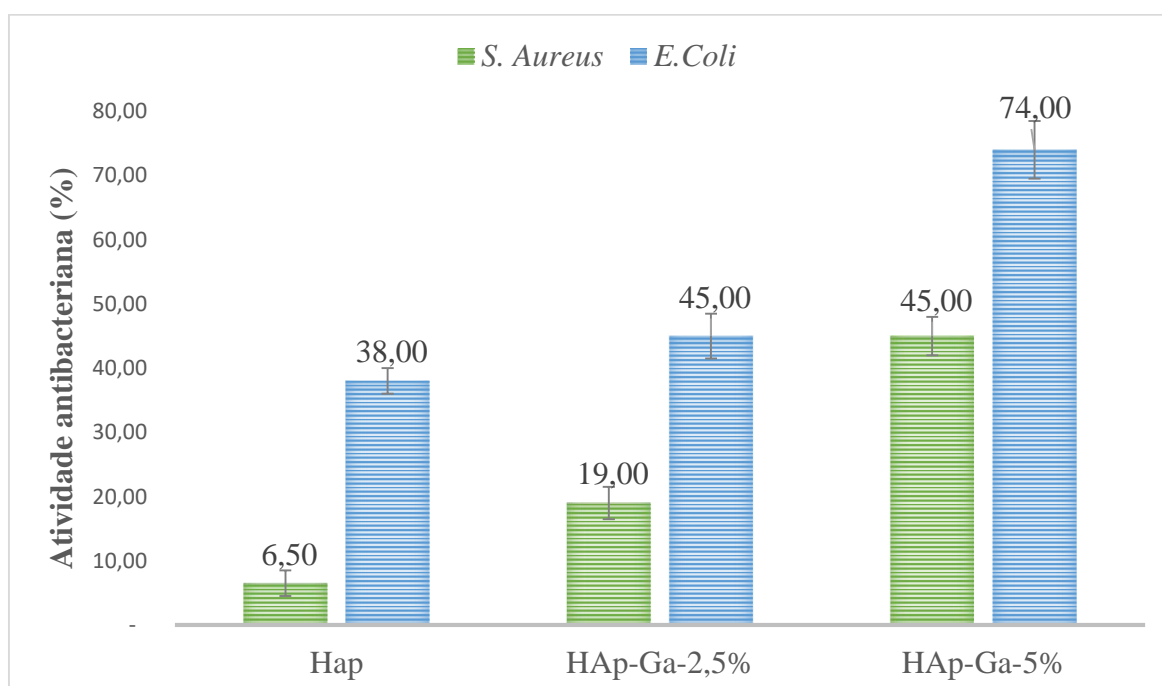
Hidroxiapatita	Ca ou (Ca+Ga)	P	Ca ou (Ca+Ga)/P
HAp	8,36	5,32	1,57
HAp-Ga-2,5%	11,73	7,06	1,66
HAp-Ga-5,0%	11,58	7,42	1,56

3.2 Ensaio biológicos

3.2.1 Teste antibacteriano

O resultado do teste de atividade antibacteriana da Hap e da HAp dopadas frente as bactérias *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922) estão na Figura 7. Verificou-se que há um aumento na atividade antibacteriana dos materiais dopados quando comparados a HAp, tal afirmação é aplicável as duas bactérias gram-positiva e gram-negativa. No entanto, o material dopado com gálio a 5,0% apresentou uma maior atividade antibacteriana que em termos de percentagem corresponde a 74% do efeito inibitório para as cepas *E. coli* (ATCC 25922) e 45% *S. aureus* (ATCC 25923).

Figura 7 – Gráfico do efeito inibitório das amostras HAp, Hap-Ga-2,5%, HAp-Ga-5%-5 sobre cepas padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e da *E. coli* (ATCC 25922).



Já para o material dopado com gálio a 2,5% teve uma atividade maior que Hap de 19% para *S. aureus* (ATCC 25923) e 45% para *E. coli* (ATCC 25922). Contudo, observa-se que o material dopado com gálio a 5,0% é o que apresenta um melhor desempenho de atividade antibacteriana e, inclusive, para as bactéria gram-negativa uma vez que é onde ocorre o maior efeito inibitório de 74%. Esses valores das porcentagens de inibição estão melhores dispostos nas Figuras 7, 8 e 9.

Figura 8 – Imagens das placas mostrando o efeito inibitório das amostras HAp, Hap-Ga-2,5%, HAp-Ga-5,0% sobre cepas padrão de *S. aureus* (ATCC 25923).

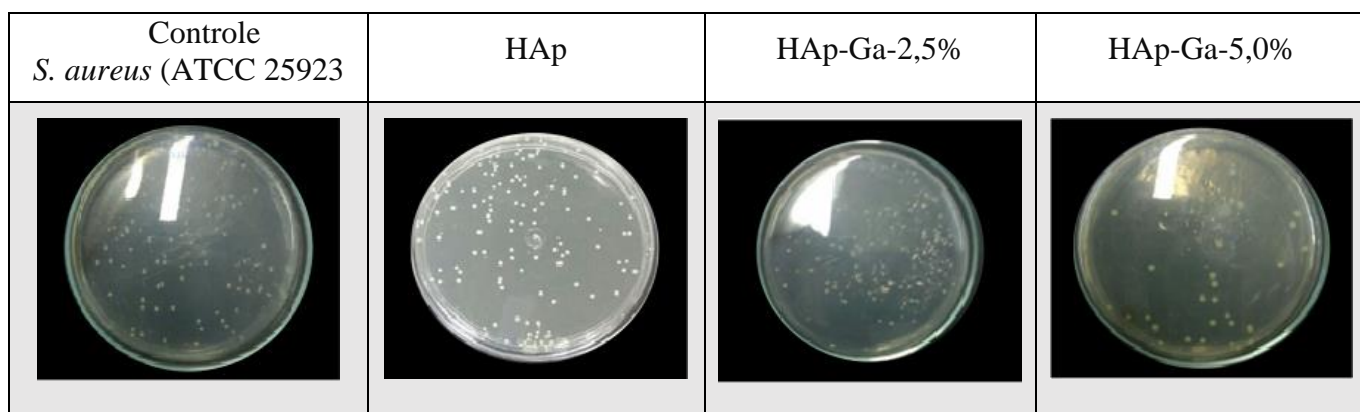
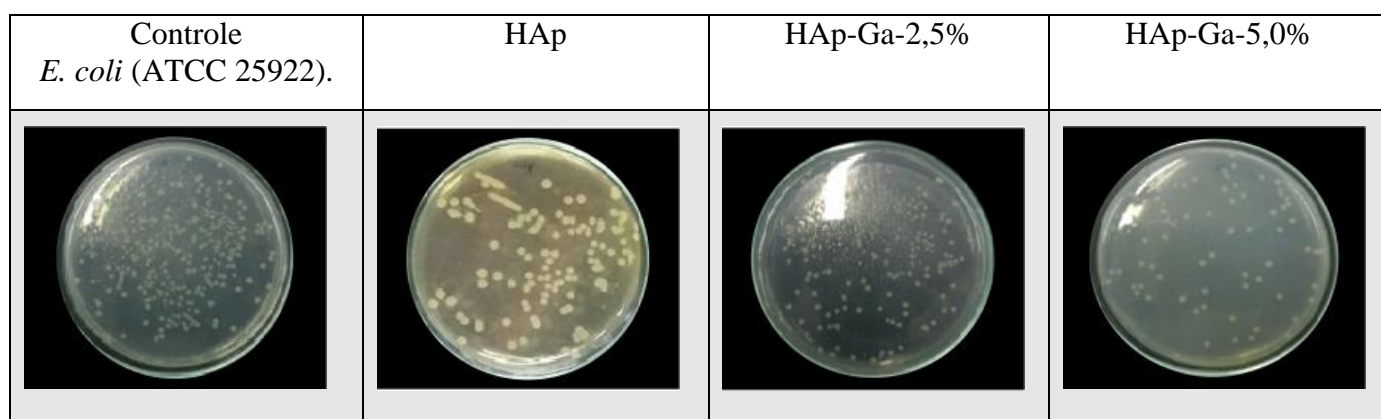


Figura 9 - Imagens das placas mostrando o efeito inibitório das amostras HAp, Hap-Ga-2,5%, HAp-Ga-5,0% sobre a cepa padrão *E. coli* (ATCC 25922).



Os resultados de inibição de crescimento bacteriano dos materiais frente as cepas das bactérias Gram-negativa, *E. coli* (ATCC 25922) e Gram-positiva *S. aureus* (ATCC 25923), que o melhoramento da atividade antibacteriana é em virtude ao íon Ga^{3+} incorporado na estrutura da HAp e que o maior destaque é para a dopada com gálio 5,0%.

Portanto, a quantidade de íon metálico na estrutura é o principal responsável por esse sucesso na inibição das cepas bacterianas *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923) uma vez como já supracitado embora não esteja explicado com certeza o mecanismo de interação entre o material e a bactéria, porém, é mais que evidente o entendimento que há interações entre a parede celular da bactéria e o íon metálico e que provavelmente o aumento do íon gálio melhora a inibição do crescimento das bactérias.

Tal material mostra-se como uma via possível de aplicação em aplicações frente a inibição de cepas bacterianas gram-negativas. Esse aumento na atividade antibacteriana frente as cepas, ocorre devido a incorporação do gálio na estrutura da hidroxiapatita, embora não se saiba com clareza como ocorre a interação entre o material e bactéria. Assim, esse resultado pode ser explicado pela ação antibacteriana dos íons Ga^{3+} , que se baseia na substituição de íons Fe^{3+} e pelo consequente bloqueio de muitas reações e enzimas redox importantes dentro de células bacterianas [27,45].

Na literatura aponta que tal mecanismo seja entre as interações entre o íon gálio presente na estrutura da hidroxiapatita com os constituintes das paredes das células bacterianas, quais sejam, peptídeos, de modo, que ocorra interações de oxirredução e/ou espécies reativas de oxigênio, dentre outras, promovendo assim, um desequilíbrio referente a permeabilidade da célula e consequentemente a ocorrência do apoptose, tendo assim um efeito inibitório de bactérias satisfatório [46].

De um modo geral, o que pode ser aferido é que o material dopado com gálio e, especificadamente, na porcentagem de 5,0% é um dispositivo promissor para a engenharia de tecido ósseo e outras aplicações, uma vez que tem resultados favoráveis frente a inibição de cepas das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.

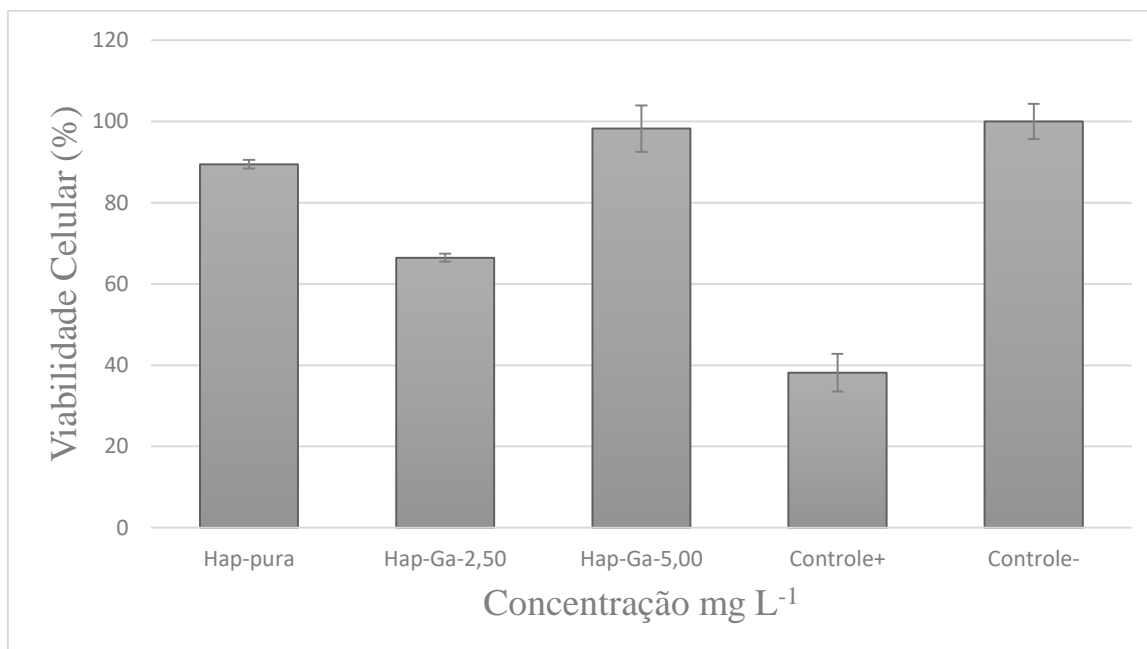
3.2.2 Teste de citocompatibilidade

A viabilidade celular para os materiais HAp e dopada com gálio foram avaliadas pelo ensaio de MTT onde o resultado está apresentado na Figura 10 pela conversão das absorvâncias em porcentagem de viabilidade.

Verifica-se que pelos dados obtidos por meio do ensaio de MTT que a amostra Hap pura apresentou um valor médio de viabilidade celular de $89,45 \pm 1,07$. No entanto, já para os materiais dopados a viabilidade celular apresentada foi mais de 60%. Vale destacar, que os valores para Hap-Ga-5,0% é bem próximo do valor do controle positivo não apresentado diferenças estatísticas. Assim, tais materiais sintetizados não

provoca a morte celular e que pode serem usados em regeneração óssea sem comprometer danos celulares.

Figura 10 – Citotoxicidade em células fibroblasto GM07492 expostas aos materiais sintetizados.



Portanto, aos materiais dopados, além de possuir atividade antibacteriana favorável, não têm efeito tóxico sobre as células, sugerindo assim, que suas propriedades biológicas, permitem que tal material possa ser aplicado como um dispositivo adequado no reparo ósseo.

4. Conclusão

As caracterizações demonstram que após dopagem com gálio nas diferentes proporções a morfologia não muda a cristalinidade do material. Nesse contexto, o teste de atividade antibacteriana frente as cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* demonstraram a eficácia dos materiais sintetizados uma vez que os materiais dopados apresentaram melhores resultados de inibição e, em especial o Ga³⁺ presente na proporção de 5%, por ter um melhor desempenho significativo na atividade inibitória de em torno de 29% (74% do efeito inibitório para as cepas *E. coli* e 45% *S. aureus*) quando comparado ao material não dopado. Ademais, o teste de citotoxicidade garante uma maior confiabilidade do material por não ser tóxico reforçando que o seu uso como um dispositivo na substituição óssea é de suma importância e especialmente ao material dopado na proporção de 5 % de gálio por apresentar aproximadamente 100% de viabilidade celular.

5. Referências

- [1] Sergey, VD. Calcium orthophosphates. *Journal of materials science*, v. 42, n. 4, p. 1061-1095, 2007.
- [2] Guillaume, O. et al. Surface-enrichment with hydroxyapatite nanoparticles in stereolithography-fabricated composite polymer scaffolds promotes bone repair. *Acta Biomaterialia*, v. 54, p. 386-398, 2017.
- [3] Ryabenkova, Y. et al. The relationship between particle morphology and rheological properties in injectable nano-hydroxyapatite bone graft substitutes. *Materials Science and Engineering: C*, v. 75, p. 1083-1090, 2017.
- [4] Sergey, VD. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials*, v. 2, n. 2, p. 399-498, 2009.
- [5] Sidney, JO. Grynepas, Marc, D. Relationships between polyphosphate chemistry, biochemistry and apatite biomineralization. *Chemical reviews*, v. 108, n. 11, p. 4694-4715, 2008.
- [6] Vallet-regí, M.; Arcos, D. *Biomimetic nanoceramics in clinical use: from materials to applications*. Royal Society of Chemistry, 2008.
- [7] Taubes, G. *The bacteria fight back*. 2008.
- [8] LEW, Daniel, PL.; Waldvogel, F.A. Osteomyelitis. *The Lancet*, v. 364, n. 9431, p. 369-379, 2004.
- [9] Jiranek W. A.; Hanssen, A.; Greenwald, AS. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *JBJS*, v. 88, n. 11, p. 2487-2500, 2006.
- [10] Bhardwaj, G.; Yazici, H.; Webster, T.J. Reducing bacteria and macrophage density on nanophase hydroxyapatite coated onto titanium surfaces without releasing pharmaceutical agents. *Nanoscale*, v. 7, n. 18, p. 8416-8427, 2015.
- [11] Kolmas, J.; Roszyk, E.; Kwiatkowska-Różycka, D. Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties. *BioMed research international*, v. 2014, 2014.
- [12] Kanchana, P., Navaneethan, M., Sekar, C. Fabrication of Ce doped hydroxyapatite nanoparticles based non-enzymatic electrochemical sensor for the simultaneous determination of norepinephrine, uric acid and tyrosine. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, 226, pp. 132-140, 2017.
- [13] Kurtjak, M.; Vukomanović, M. Suvorov, D. Antibacterial nanocomposite of functionalized nanogold and gallium-doped hydroxyapatite. *Materials Letters*, v. 193, p. 126-129, 2017.
- [14] Yilmaz, B., Evis, Z., Tezcaner, A., Banerjee, S.. Surface Characterization and Biocompatibility of Selenium-Doped Hydroxyapatite Coating on Titanium Alloy. *International Journal of Applied Ceramic Technology* 13(6), pp. 1059-1068, 2016.
- [15] Samudrala, R., Abdul Azeem P, Penugurti, V., Manavathi, B. Cytocompatibility studies of titania-doped calcium borosilicate bioactive glasses in-vitro. *Materials Science and Engineering C* 77, pp. 772-779, 2017.
- [16] Huang, Y., Hao, M., Nian, X., Qiao, H. Zhang, X., Zhang, X., Song, G., Guo, J. Pang, X., Zhang, H. Strontium and copper co-substituted hydroxyapatite-based coatings with improved antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by electrodeposition. *ACS Applied Materials and Interfaces* Volume 8, Issue 19, 12404-12421, 2016.
- [17] Yazici, M., Gulec, A.E., Gurbuz, M., Gencer, Y., Tarakci, M. Yazici, M., Gulec, A.E., Gurbuz, M., Gencer, Y., Tarakci, M. Biodegradability and antibacterial properties of MAO coatings formed on Mg-Sr-Ca alloys in an electrolyte containing Ag doped hydroxyapatite. *Thin Solid Films* 644, pp. 92-98, 2017.

- [18] Carvalho, D. C. et al. Characterization and catalytic performances of copper and cobalt-exchanged hydroxyapatite in glycerol conversion for 1-hydroxyacetone production. *Applied Catalysis A: General*, v. 471, p. 39-49, 2014.
- [19] Shepherd, J.H.; Shepherd, D.; Avid, V.; Best, S.M. Substituted hydroxyapatites for bone repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 23, n. 10, p. 2335-2347, 2012.
- [20] Noor, Z. Nanohydroxyapatite application to osteoporosis management. *Journal of osteoporosis*, v. 2013, 2013.
- [21] Shannon, R. D. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta crystallographica section A: crystal physics, diffraction, theoretical and general crystallography*, v. 32, n. 5, p. 751-767, 1976.
- [22] Chitambar, CR. Medical applications and toxicities of gallium compounds. *International journal of environmental research and public health*, v. 7, n. 5, p. 2337-2361, 2010.
- [23] Datta, H.K.; Ng, W.F.; Walker, J.A.; Tuck, S.P.; Varanasi, S.S. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*, 2008, 61, 577-587.
- [24] Greenwood, N. N.; Earnshaw, A. *Chemistry of the Elements 2nd Edition*. Butterworth-Heinemann, 1997.
- [25] Harris, WR.; Pecoraro, V.L. Thermodynamic binding constants for gallium transferrin. *Biochemistry*, v. 22, n. 2, p. 292-299, 1983.
- [26] Bernstein, L.R. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharmacological reviews*, v. 50, n. 4, p. 665-682, 1998.
- [27] Ganguly, BN. et al. Study of Gallium Oxide Nanoparticles Conjugated with β -Cyclodextrin: An Application to Combat Cancer. *ACS applied materials & interfaces*, v. 8, n. 27, p. 17127-17137, 2016.
- [28] Kaneko, Y. et al. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *The Journal of clinical investigation*, v. 117, n. 4, p. 877, 2007.
- [29] Hoppe, A.; Guldal, NS.; Boccaccini, Aldo, R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, v. 32, n. 11, p. 2757-2774, 2011.
- [30] Unabia, R. et al. Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate using Ca (OH) 2 and (NH4) H2PO4. *physica status solidi (c)*, v. 12, n. 6, p. 572-575, 2015.
- [31] Person, A. et al. Diagenetic evolution and experimental heating of bone phosphate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, v. 126, n. 1-2, p. 135-149, 1996.
- [32] Shemesh, A. Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 54, n. 9, p. 2433-2438, 1990.
- [33] Puceat, E; Reynard, B.; Lecuyer, C. Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites *Chemical Geology*, v. 205, n. 1, p. 83-97, 2004.
- [34] Zheng, L.; & Zhu, J. Study on antimicrobial activity of chitosan with diferente molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54, 527-530, 2003.
- [35] ARUL, K. Thanigai et al. Novel multifunctional of magnesium ions (Mg²⁺) incorporated calcium phosphate nanostructures. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 730, p. 31-35, 2018.
- [36] Melnikov, P. et al. Gallium-containing hydroxyapatite for potential use in orthopedics. *Materials Chemistry and Physics*, v. 117, n. 1, p. 86-90, 2009.

- [37] Vieira, E.G.; Sousa, P.A.A.; Matos, J.M.E.; Santos, M.R.M.C. Síntese pelo método da coprecipitação e caracterização estrutural do tungstato de cálcio com estrutura tipo scheelita. *Cerâmica*, v. 59, n. 351, p. 417-425, 2013.
- [38] Cavalcante, L.S. Longo, V.M.; Sczancoski, J.C.; Almeida, M.A.P.; Batista, A.A.; Varela, J.A.; Orlandi, M.O.; Longo, E.; Siu Li, M. Electronic Structure, Growth Mechanism And Photoluminescence Of CaWO_4 Crystals. *CrystEngComm*, V. 14, P. 853-868, 2012.
- [39] Kebiroglu, M.H.; Orek, C.; Bulut, N.; Kaygili, O.; Keser, S.; Ates, T. Temperature Dependent Structural and Vibrational Properties Of Hydroxyapatite: A Theoretical And Experimental Study. *Ceramics International*, V. 43, P. 15899-15904, 2017
- [40] Liao, C. Jen et al. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials*, v. 20, n. 19, p. 1807-1813, 1999.
- [41] Gopi, D. et al. Strontium, cerium co-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, characterization, antibacterial activity towards prokaryotic strains and in vitro studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 451, p. 172-180, 2014.
- [42] Koutsopoulos, Synthesis. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 62, n. 4, p. 600-612, 2002.
- [43] Pucéat, E.; Reynard, B.; Lécuyer, C. Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites. *Chemical Geology*, v. 205, n. 1, p. 83-97, 2004.
- [44] Shemesh, A.o. Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 54, n. 9, p. 2433-2438, 1990.
- [45] Dudley, H. C.; Maddox, GE. Deposition of radio gallium (Ga^{72}) in skeletal tissues. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 96, n. 3, p. 224-227, 1949.
- [46] Díaz-Visurraga, J. et al. Metal nanostructures as antibacterial agents. *Science And Technology Against Microbial Pathogens: Research, Development and Evaluation*. Badajoz: Formatex, p. 210-218, 2011.

CAPÍTULO 4:

Efeito da hidroxiapatita incorporada com íons gálio (Ga^{3+}) ou cério (Ce^{3+}) na reparação óssea em ratas com osteoporose induzida por ovariectomia

Marcos Pereira da Silva^a, Ewerton Gomes Vieira^a, Ana Cristina Vasconcelos Fialho^b, Antônio Maia Filho^c, Josy Antevéli Osajima^a, Edson Cavalcanti da Silva Filho^a

^aLaboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina-PI, Brasil

^bDepartamento de Patologia e Clínica Odontológica, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina-PI, Brasil

^cUniversidade Estadual do Piauí, Campus Central, 64000-040, Teresina-PI, Brasil

Resumo

A perda óssea é um problema de saúde pública podendo ser originadas por vários fatores. Uma das principais causas é a osteoporose doença caracterizada pela redução da massa óssea e da deterioração microestrutural do tecido ósseo. Diante disso, terapêuticas são empregadas, como, medicamento, autoenxerto, aloenxerto e xenoenxerto. No entanto, nem sempre obtendo sucesso devido a infecções, incompatibilidade, dentre outros. A hidroxiapatita por ser um material semelhante ao osso humano se destaca. Além disso, pode ter suas propriedades biológicas melhoradas com a incorporação de íons metálicos na sua estrutura. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da hidroxiapatita incorporada com íons gálio ou cério na reparação óssea, após aplicação em defeitos ósseos nas tíbias de ratas com osteoporose induzida. No estudo, foram realizados defeitos ósseos de 2 mm de diâmetro em 72 animais. Após 15 e 30 dias dos implantes, as amostras foram analisadas por Micro-CT, Raman e histologicamente. As caracterizações mostraram que os animais que tiveram os defeitos preenchidos com os materiais apresentaram neoformação óssea mais expressiva do que o grupo controle negativo. Demonstrando, que a hidroxiapatita incorporada com íons de cério ou gálio possuem potencialidade na regeneração óssea em defeitos de ratas com osteoporose.

Palavras-Chave: hidroxiapatita, osteoporose, regeneração óssea, gálio, cério.

Abstract

Bone loss is a public health problem that can be caused by several factors. One of the main causes is an osteoporosis disease characterized by the reduction of bone mass and the microstructural deterioration of the bone tissue. Therefore, the techniques are employed, such as medicine, autograft, allograft and xenograft. However, they are not successful due to infections, incompatibility, among other reasons. Thus, hydroxyapatite as a material similar to human bone stands out. And, in addition, it can have its biological properties improved with the incorporation of metallic ions in its structure. Therefore, the present study aimed to evaluate the bone repair after application of hydroxyapatite incorporated with gallium and cerium ions in defects in wistar rats with induced osteoporosis. In the study, 2 mm diameter defects were performed on 72 animals. After 15 and 30 days of the implants, the samples were characterized by Micro-CT, Raman and Histological. The characterizations showed that the animals that had the defects filled with the materials showed more bone neoformation than the negative control group. It shows that hydroxyapatite incorporates the functions of cerium and gallium have potential in bone regeneration in defects of rats with osteoporosis.

Keywords: Hydroxyapatite, osteoporosis, bone regeneration, gallium, cerium.

1. Introdução

Um dos fatores limitantes em cirurgias reconstrutivas é o preenchimento de defeitos ósseos. Dentre as várias causas que podem acarretar os defeitos ou fraturas ósseas, destaca-se a osteoporose. A osteoporose é uma doença osteometabólica relacionada à idade e caracterizada pela perda de massa óssea e deterioração microestrutural do tecido ósseo, a um nível crítico para fraturas. Logo, é um problema de saúde pública em virtude do aumento da população idosa, acometendo principalmente as mulheres devido à menopausa, uma vez que sofrem com a perda óssea adicional [1]. Acredita-se que, em média, 50% das mulheres com idade igual ou superior a 50 anos devam sofrer fratura em decorrência a osteoporose ao longo da vida [2].

Diante deste quadro, várias medidas de tratamento, medicamentosos ou não, são empregadas, para dirimir tal problema. Além disso, com o auxílio da engenharia tecidual e medicina regenerativa o uso de autoenxerto, aloenxerto e xenoenxerto tem sido proposto. Porém, observa-se que essas técnicas apresentam alguns empecilhos para sua aplicação, tais como, elevado risco de infecções e incompatibilidade biológica. Devido às dificuldades para o uso do autoenxerto, aloenxerto e xenoenxerto, materiais biotivos estão recebendo atenção crescente [3-5].

A hidroxiapatita é um material bioativo muito usada em processo de regeneração óssea, uma vez que é similar ao constituinte inorgânico do osso humano, além disso, possuem propriedades biológicas satisfatórias [6-7]. A estrutura desse biomaterial permite a substituição de íons de cálcio por outros íons, tal como, o do gálio (Ga^{3+}) e cério (Ce^{3+}). Isso pode, de forma desejável, promover o melhoramento do biomaterial no tocante as suas propriedades biológicas, físico-químicas, propriedades mecânicas e antimicrobianas [8-9].

Estudos com os íons de magnésio, estrôncio e zinco revestindo materiais cerâmicos demonstraram efeitos satisfatórios em regeneração óssea nos animais com fraturas provocadas por osteoporose [10-15]. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da hidroxiapatita incorporada com os íons gálio (Ga^{3+}) ou cério (Ce^{3+}) na reparação óssea de defeitos produzidos em ratas com osteoporose induzida por ovariectomia.

2. Parte Experimental

2.1 Aspectos éticos

O protocolo experimental para estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual do Piauí (CEUA/UESPI) nos termos da lei n° 11.794/2008, sob o processo de número 0097/2017 (ANEXO).

2.2 Animais

Utilizaram-se *Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*, fêmeas, com idade de 8 semanas, pesando $200\text{g} \pm 40\text{g}$, oriundos do biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual do Piauí (FACIME/UESPI). Durante o experimento, cada animal foi mantido em caixas de polipropileno, sob condições controladas (temperatura entre 22 a 24 °C, 40-60% de umidade, com ciclos de claro e escuro de 12/12h), com acesso *ad libitum* a comida e bebida.

2.3 Biomateriais

O material hidroxiapatita incorporada com os íons gálio ou cério foram obtidos pelo Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados da Universidade Federal do Piauí (LIMAV-UFPI) e caracterizados pelas técnicas de DRX, XPS, FTIR, MEV-EDS, Raman e TG. Selecionaram-se os materiais dopados a 5 % para gálio ou cério devido ter apresentado propriedades biológicas melhoradas conforme demonstrados nos capítulos 2 e 3. Utilizaram-se a forma de pó para os experimentos em animais.

2.4 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em 04 (quatro) grupos com 09 (nove) animais, cada grupo, em dois tempos pós-operatórios, de 15 (quinze) e 30 (trinta) dias. O grupo Sham (CS), onde foi simulada a ovariectomia; o grupo Controle Coágulo (CC), em ratas ovariectomizadas, ficando o defeito preenchido por coágulo, sem nenhum tratamento; grupo gálio (OVX-HAp-Ga), em ratas ovariectomizadas, onde os defeitos críticos foram preenchidos com hidroxiapatita incorporada com gálio e o grupo do cério (OVX-HAp-Ce), em ratas ovariectomizadas, onde os defeitos críticos foram preenchidos pela hidroxiapatita incorporada com cério. O experimento foi realizado no Laboratório do Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estadual do Piauí-UESPI.

2.5 Procedimento cirúrgico

Para realização dos procedimentos cirúrgicos das ovariectomias, os animais receberam atropina por via cutânea, na dose de 0,04 mL/100 g, após 20 minutos iniciou o procedimento anestésico. Posteriormente as ratas foram anestesiadas com ketamina (50 mg) associada com xilazina (2 %) (cloridrato de xilazina 0,2 % - virbaxyl®) na proporção de (2:1) 0,1 mL /100 g de peso vivo e colocadas em decúbito lateral. Em cada lado, na região do flanco se realizou uma incisão de 1,0 a 1,5 cm incidindo sobre a pele e tecido celular subcutâneo. Após isso, foi feito a abertura da cavidade peritoneal por divulsão das camadas musculares e peritônio. Por meio de cada incisão foi

localizado o ovário correspondente. Assim, realizou uma ligadura na junção útero-tubárica, envolvendo toda a vascularização do ovário, e secção da tuba e demais estruturas entre a ligadura e o ovário, o qual foi removido. O corno uterino foi recolocado na cavidade abdominal e posteriormente feita a sutura da incisão em planos separados.

Após 60 (sessenta) dias da ovariectomia, procedimentos cirúrgicos foram realizados para produção dos defeitos ósseos em tíbias dos animais. Utilizando uma broca de esférica de aço n° 8, montada em um micromotor cirúrgico Lb-Beltec, e irrigação com soro fisiológico, foi realizado um defeito ósseo na porção lateral da tíbia de cada animal, monocortical com diâmetro de 2 mm e profundidade até atingir o canal medular.

Apenas os defeitos dos grupos do gálio e do cério foram preenchidos com a hidroxiapatita incorporada com gálio ou com o cério, respectivamente. A pele foi suturada com fio de nylon 4.0, agulhado. Após o procedimento cirúrgico, a cada seis horas, foi realizada terapia analgésica com tramadol com dose de 0,02 mL/100 g por via intramuscular profunda, durante as primeiras 24 horas pós-operatórias. A temperatura ambiente foi controlada entre 21 a 26 °C.

Os animais foram mantidos no biotério da FACIME/UESPI durante os períodos experimentais, com ração padrão e água *ad libitum* e foram observados periodicamente para verificar se ocorreram anormalidades comportamentais e sistêmicas.

2.6 Processamento tecidual

Ao final do período experimental, para os dois tempos pós-operatórios, 15 (quinze) e 30 (trinta) dias para cada grupo, os animais foram eutanasiados de acordo com os princípios éticos adequados (COBEA) para a dissecação das amostras que foram submetidas à análise. A eutanásia foi realizada com superdose da associação anestésica de xilazina (10 mg/kg) e ketamina (80 mg/kg) preparados na mesma seringa e administrados por via intramuscular profunda. Após período de latência, e imediatamente após constatação de parada cardiorrespiratória, as peças com áreas de interesse foram removidas e fixadas em solução de formol neutro a 10%, lavadas e descalcificadas em solução de ácido fórmico a 30%, após colocadas em gás nitrogênio para posterior análise através de Microtomografia computadorizada, espectroscopia Raman confocal e histológica.

2.7 Dosagem de cálcio

Antes da eutanásia amostras de sangue foram coletadas das ratas wistar de forma aleatória em média 2 (dois) animais por grupos. A análise sanguínea dos animais foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade

Federal do Piauí. As amostras de sangue coletadas foram submetidas à centrifugação em 3500 rpm por 5 minutos e o soro foi separado para dosagem do cálcio.

2.8 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Para análises dos dados utilizou-se o teste t de Student, expressos como médias e desvio padrão. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%.

2.9 Espectroscopia Raman Confocal

Os espectros foram obtidos usando o microscópio Senterra Confocal Raman (Bruker) acoplado a um dispositivo de carga acoplada (CCD). O laser foi utilizado em 785 nm, excitação de comprimento de onda, com uma lente de 40 × para a observação das amostras. O sinal Raman foi coletado por um CCD e registrado em um computador conectado ao sistema. A potência absorvida pela amostra é de aproximadamente 20 mW com duas integrações de 10 s cada (aproximadamente 20 s por espectro). A resolução espacial axial foi de 5 μm e foi relatada em todos os grupos; Além disso, no grupo C, outro ponto é coletado no osso cortical normal (B), além do ponto na região cortical para servir o controle positivo. Para eliminar a fluorescência dos espectros, um polinômio de quarta ordem foi realizado para cada espectro nas regiões de 900-1200 cm⁻¹ e 2700-3500 cm⁻¹. Este procedimento foi realizado utilizando o PeakFit para caracterizar alterações em componentes minerais do osso neoformado [16].

2.10 Análise Histológica

Espécimes da tíbia incluindo a área correspondente ao defeito ósseo foram fixados em formalina tamponada neutra durante a noite, seguindo-se a descalcificação com EDTA por duas semanas. Após a descalcificação, os espécimes foram submetidos a processamento histológico de rotina desidratados, desparafinizados e embebidos em parafina a 58°. Cortes de 5 μm foram realizados em micrótomo e corados com hematoxilina e eosina (H.E.) para exame de microscopia óptica.

2.11 Análise por Microtomografia Computadorizada

As áreas de interesse das tíbias, com os defeitos, foram escaneadas utilizando a microtomografia computadorizada (μCT-SkyScan 1172, Bruker, USA) com os seguintes parâmetros de aquisição, 80kV, 120 μmA, 14 μm, 0,5 mm filtro Al, 0.3° parcela de giro e 3 *frames*. Para a reconstrução dos volumes o software NRecon (μCT-SkyScan 1172, Bruker, USA) foi utilizado com as seguintes correções de artefato: 2 de suavização, 5 de redução

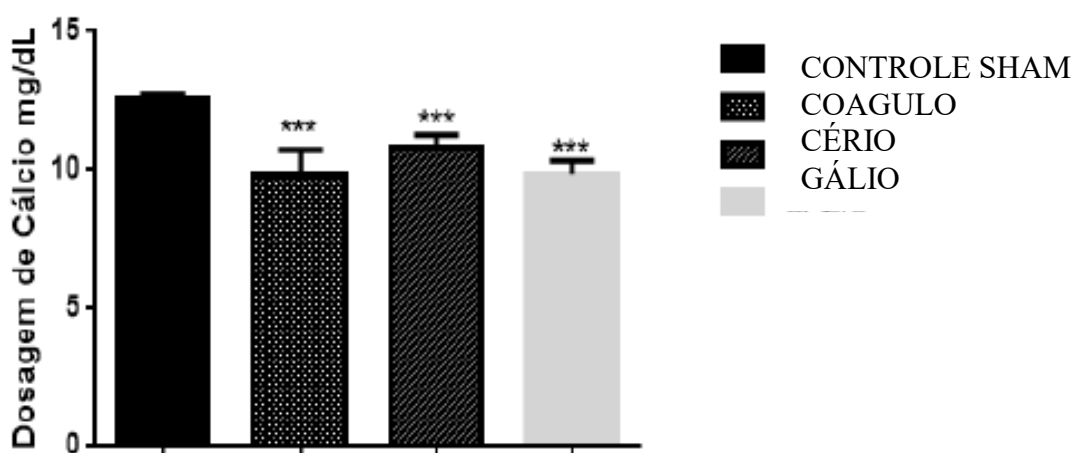
de artefatos em anéis e 20% de redução de fenômeno de endurecimento do feixe. As imagens reconstruídas foram reorientadas no software Dataviewer (μ CT-SkyScan 1172, Bruker, USA), para a visualização em posição padrão (axial) de todos os defeitos. Para análise dos parâmetros de qualidade óssea o CTAn (μ CT-SkyScan 1172, Bruker, USA) foi utilizado, a região de interesse analisada consistiu em uma estrutura em formato de disco, com 2 mm de diâmetro e 50 cortes axiais de altura. Por meio do software CTVOx (μ CT-SkyScan 1172, Bruker, USA) as imagens tridimensionais foram geradas e editadas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Dosagem de cálcio

O parâmetro hematológico está demonstrado na Figura 1, e será considerado como referência para avaliação dos resultados em procedimentos experimentais que utilizarem roedores do Laboratório da UESPI. A adoção de tal medida é devido a literatura apresentar discordâncias entre os valores obtidos para os parâmetros hematológicos e bioquímicos. Em virtude disso, é pertinente a relevância de estabelecer valores de referência para cada biotério ou laboratório [17].

Figura 1 - Dosagem da concentração de cálcio para as ratas wistar.



Fonte: Autoria própria, 2018. ***= $p < 0,001$.

Fonte: Autoria própria, 2018. ***= $p < 0,001$.

Deste modo, foi possível avaliar pela dosagem de cálcio que as ratas Wistar submetidas a ovariectomia apresentaram uma redução significativa na quantidade de cálcio quando comparada com as ratas Wistar do controle positivo. Portanto, ratificando que o processo de indução de osteoporose se procedeu de forma satisfatória.

Sendo assim, como a maior parte do cálcio do corpo humano encontra-se no tecido ósseo é evidente que a diminuição na quantidade de cálcio sugere uma perda de massa

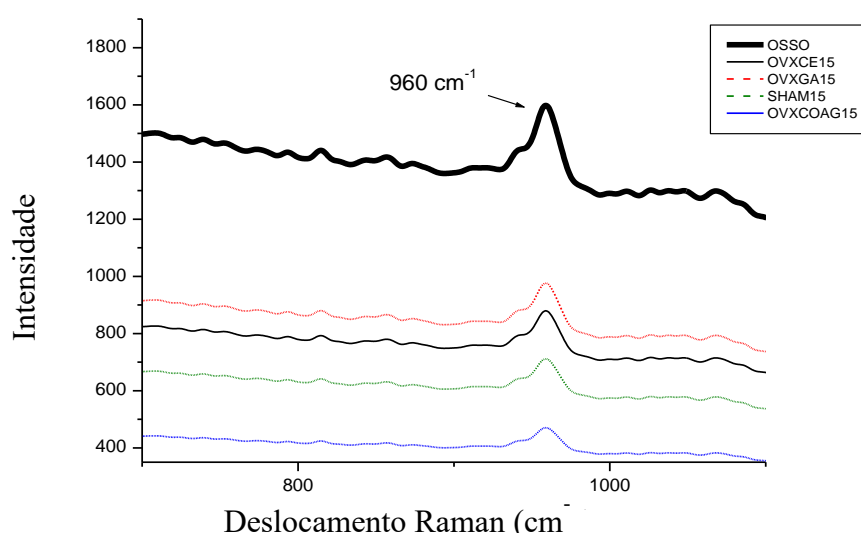
óssea, conseqüentemente, alteração na microarquitetura óssea, tornando-a mais frágil o osso, portanto, mais susceptível a fraturas.

Essa tendência na redução de cálcio é evidente para os grupos das ratas que foram realizadas ovariectomias, quais sejam, grupo do coágulo, grupo do cério e do gálio, pois estatisticamente apresentam diferenças significativas quando comparados com ao grupo sham (controle positivo). No entanto, os grupos que foram submetidos a ovariectomias não apresentam diferenças significativas o que mostra ser satisfatório o resultado. Assim, a dosagem de cálcio permite inferir que a indução da osteoporose por ovariectomia ocorreu de forma desejável.

3.2 Espectroscopia Raman do tecido ósseo

A Figura 2 apresenta o espectro de Raman do tecido ósseo dos 04 (quatro) grupos de tratamento (CS-controle sham; CG-controle coágulo; OVX-Hap-Ga e OVX-Hap-Ce); os grupos, após a eutanásia aos 15 dias (a) e 30 dias (b). O Espectro Raman do tecido ósseo correspondente ao valor de 960 cm^{-1} indicou diferenças relevantes entre os grupos. Os espectros mostraram que os grupos tinham as mesmas posições de pico, mas as intensidades diferentes estatisticamente. Os grupos OV-Hap-Ga e OVX-Hap-Ce apresentam maiores intensidade de pico e os grupos CS e CC as menores intensidades para ambos os períodos de avaliação.

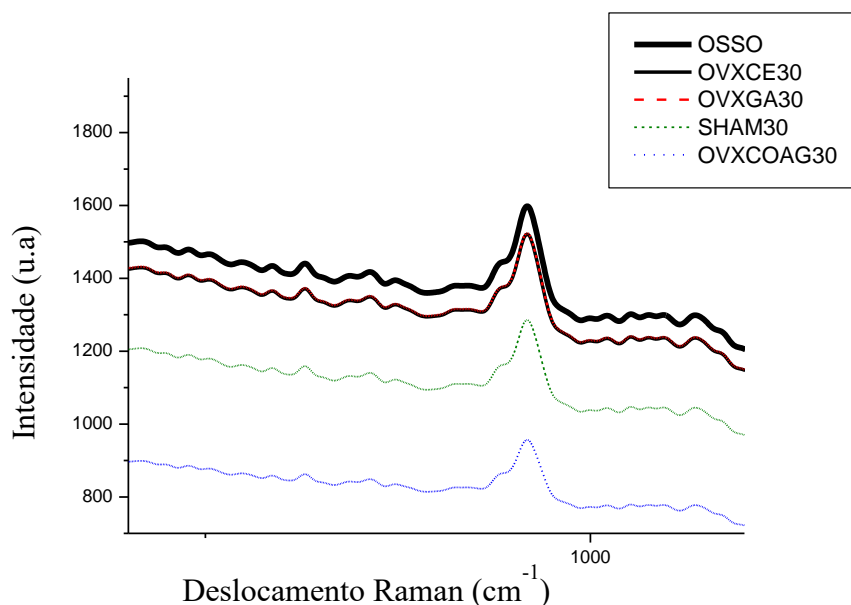
Figura 2 - Espectro do Raman 15 dias para os grupos controle positivo (Osso), OVXCE15, OVXGA15, SHAM15 e OVXCOAG15.



O pico de aproximadamente 960 cm^{-1} ($\nu_1\text{ PO}_4^{3-}$) foi usado para obter a área integrada pelo espectro Raman. Essa área está estritamente vinculada à quantidade de hidroxiapatita no osso neoformado, significando que o quanto maior a intensidade, maior o teor de fosfato

[18]. Para cada grupo, a intensidade média do pico em 960 cm^{-1} foi calculada. Os resultados da espectroscopia Raman obtidos da região cortical do osso nos períodos de 15 e 30 dias após a cirurgia será mostrado nas Figuras 2 e 3.

Figura 3 - Espectro do Raman 30 dias para os grupos controle positivo (OSSO), OVXCE30, OVXGA30, SHAM30 e OVXCOAG30.



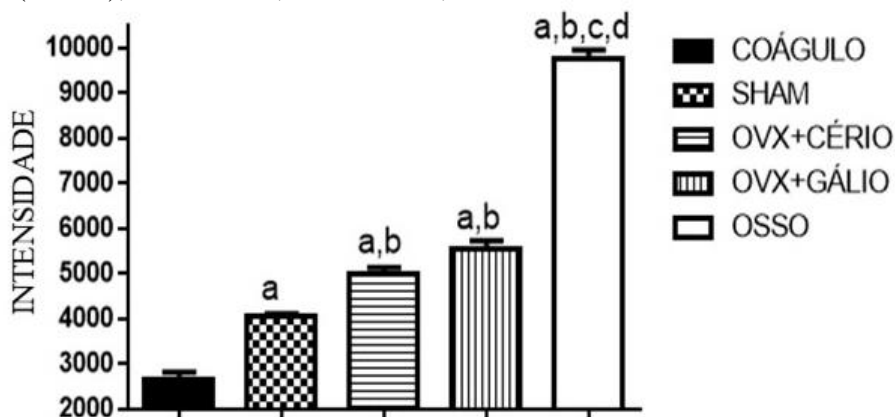
Diante disso, os espectros do Raman indicam que os grupos OVX-Hap-Ga e OVX-Hap-Ce com 30 dias apresentam mineralização óssea bem-sucedida. E que a maior intensidade no pico 960 cm^{-1} para o grupo mencionado pode estar associada com maior deposição de cálcio e maturação óssea significativa. Isso, permite apontar que a hidroxiapatita incorporada com íon gálio ou cério potencializa o processo de osteogênese em defeitos causados por osteoporose.

A análise estatística dos dados do pico de fosfato (960 cm^{-1}) no 15º (décimo quinto) dia mostrou uma área significativamente maior no grupo CS do que no CC ($p < 0,05$). Áreas estatisticamente maiores foram observadas no grupo OVX-Hap-Ga e OVX-Hap-Ce do que nos grupos CS e CC ($p < 0,05$). No entanto, a área integrada não foi estatisticamente diferente entre os grupos OVX-HAp-Ga e OVX-HAp-Ce ($p > 0,05$). Entretanto, há diferença estatística na área entre o grupo OSSO em relação às áreas dos demais grupos. Após o 30º (trigésimo) dia, os grupos apresentaram estatisticamente mesmo o comportamento 15º (décimo quinto). No entanto, os grupos OVX-Hap-Ga e OVX-Hap-Ce estatisticamente não há diferenças ($p > 0,05$). A quantidade de hidroxiapatita no osso mostrou uma gradação clara com o aumento da área de fosfato na ordem crescente

COÁGULO > SHAM > OVX-Hap-Ga = OVX-Hap-Ce > OSSO, em ambos os períodos, conforme a Figura 4 e 5

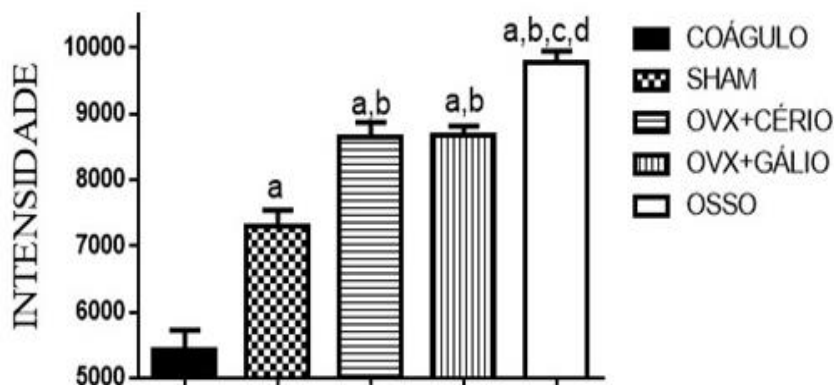
A análise por espectroscopia Raman foi utilizada para avaliar o conteúdo mineral do osso após os defeitos ósseos, uma vez que análise é mais específica para identificar a composição química da hidroxiapatita [19]. Devido a isso foi possível obter espectros de Raman e a intensidade do pico do osso neoformado após 15 e 30 dias e sugerir que os grupos OVX+CÉRIO E OVX+GÁLIO, apresentaram formação óssea estatisticamente superior ao grupo SHAM, demonstrando que os grupos que foram aplicados os materiais nos defeitos possuem potencialidades em regeneração óssea nas fraturas provocadas por osteoporose. Deste modo, é possível sugerir que esses materiais são promissores na reparação óssea.

Figura 4 - Análise estatística obtida pelo Raman 15 dias para os grupos controle positivo (OSSO), OVXCE15, OVXGA15, SHAM15 e OVXCOAG15.



Legenda: a= $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; b= $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SHAM; C= $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVX+CÉRIO; d= $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVX+GÁLIO;

Figura 5 - Análise estatística obtida pelo Raman 30 dias para os grupos controle positivo (OSSO), OVXCE30, OVXGA30, SHAM30 e OVXCOAG30;



Legenda: a= $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; b= $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SHAM; C= $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVX+CÉRIO; d= $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVX+GÁLIO

3.3 Análise Histológica

Na análise histológica observou-se que em todos os grupos e etapas de experimentação ocorreu neoformação óssea subperiosteal e subendosteal e consequente preenchimento do defeito, com discretas variações na remodelagem e maturação entre os grupos. Em nenhum dos grupos o tecido ósseo neoformado apresentou padrão organizacional secundário ou lamelar, característica do osso maduro. Restos do material implantado também puderam ser vistos nos grupos gálio ou cério.

A análise dos grupos com 15 dias do pós-operatório verificou-se no grupo CS que na maioria dos espécimes, neoformação óssea de aspecto trabecular preenchendo o defeito ósseo, com uma matriz de aspecto primário ou entrelaçado contendo osteoblastos e osteócitos aprisionados, distribuídos aleatoriamente (Figura 6A).

No grupo CC a maioria dos espécimes apresentaram neoformação óssea com aspecto em geral muito imaturo, com deposição em trabéculas delgadas e irregulares de material osteóide não mineralizado (Figura 6B).

Os defeitos ósseos de todas os espécimes do grupo OVX-HAp-Ga, mostraram neoformação óssea intensa. O tecido ósseo neoformado apresentou trabeculado imaturo, com numerosos osteoblastos e osteócitos, demonstrando melhor neoformação do tecido ósseo com apenas 15 dias quando comparado com os controles, conforme Figura 6C.

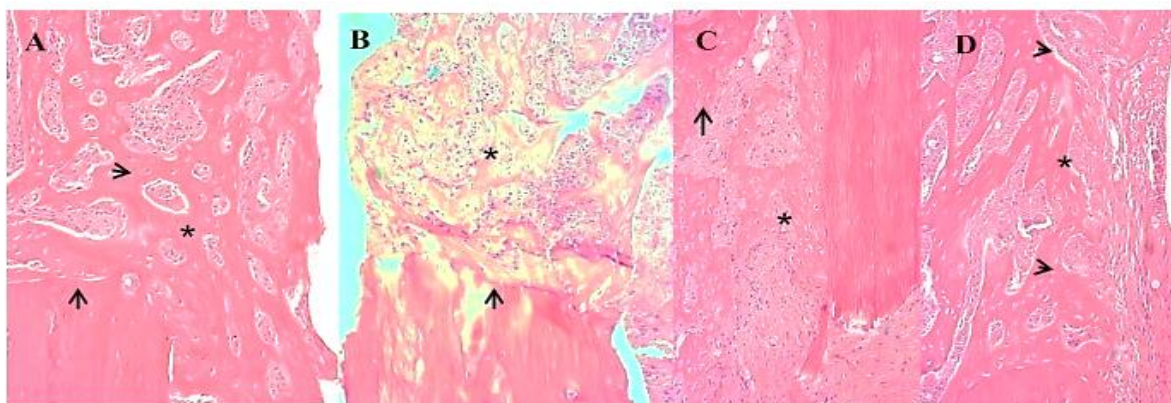
Os espécimes do grupo OVX-HAp-Ce exibiram neoformação óssea, também intensa, e de aspecto trabecular, com osteoblastos e osteócitos se distribuindo de forma mais espaçada de que no grupo gálio (Figura 6D).

Segundo o trabalho de Adrielle *et al* (2018), que consistiu em avaliar a reparação óssea após a aplicação em ratos de um *scaffold* membrana de norbixina estimulado por laser, demonstrou pela histologia as células de neoformação óssea para o grupo preenchido com o material de forma mais organizada e aspecto lamelar. No entanto, para o grupo não preenchido com o material foi observado comportamento de grande quantidade de infiltrado inflamatório e menor formação óssea, no período de 15 dias após a aplicação do material [20].

Soma-se ao mencionado no parágrafo, o estudo de Li *et al* (2017), que teve como objetivo avaliar a reparação óssea em ratas com osteoporose induzidas após aplicação do fosfato de cálcio incorporado com lítio. Assim, a histologia revelou que os animais em que foram aplicados o material teve neoformação óssea. Entretanto, os animais sem o material tiveram neoformação óssea menos expressivas apresentado tecido conjuntivo fibroso, após

o período de 30 dias [21]. Deste modo, a literatura corrobora com o resultado obtido no presente estudo.

Figura 6 - Em todos os grupos a neoformação óssea trabecular (*) foi de aspecto imaturo, com número variável de osteoblastos e osteócitos (setas). A: Grupo CS. B. Grupo CC. C. Grupo OVX-HAp-Ga. D. Grupo OVX-HAp-Ce. H.E., 10x.



O grupo CS, aos 30 dias do pós-operatório, apresentou neoformação óssea compacta mais ainda não modelada, com aspecto primário, com osteócitos e osteoblastos pouco abundantes e espaçados, ocupando quase todo o espaço da área do defeito na maioria dos espécimes (Figura 7A).

A neoformação óssea apresenta-se compacta, porém mais delgada no grupo CC que nos demais grupos, e ainda com matriz de aspecto imaturo e trabeculado, com raros osteoblastos, preenchendo todo o defeito ósseo. Resultado esperado por ter ocorrido a ovariectomia sem preenchimento com nenhum biomaterial, conforme Figura 7B.

Quando se analisou o grupo OVX-Hap-Ga se verificou, em toda a área do defeito, tecido ósseo formado mais compacto embora não totalmente organizado, mantendo um aspecto lamelar (Figura 7C).

Todos os espécimes do grupo OVX-HAp-Ce apresentaram neoformação óssea, com áreas predominantemente compactas e matriz pouco organizada ou lamelar contendo osteoblastos relativamente escassos, ocupando toda a área do defeito (Figura 7D).

Em conformidade com o trabalho de Wen *et al* (2015), que observou a regeneração óssea em ratas após a influência do fármaco sinvastatina incorporado na hidroxiapatita-titânio. No tocante a histologia foi verificada que os grupos que foram aplicados o compósito teve neoformação óssea expressiva. Entretanto, para o grupo onde não foi aplicado o material contendo o fármaco teve presença de poucas células

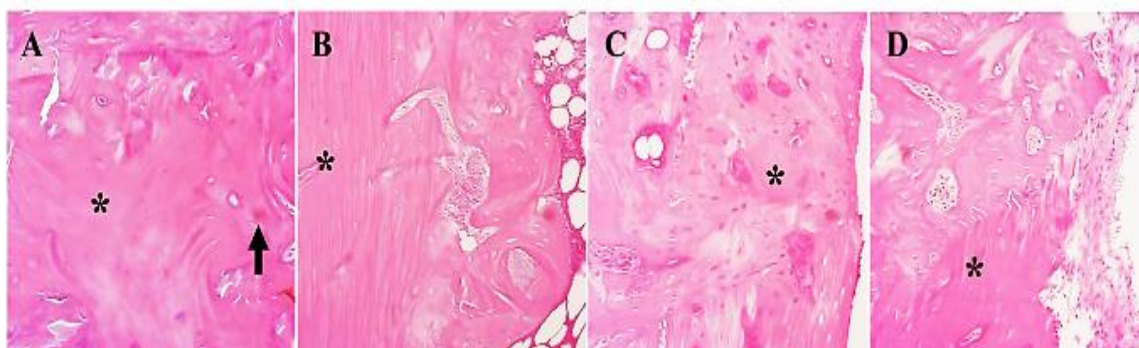
características da neoformação óssea, no período de 30 dias após aplicação do material. [22]. Desta forma, a literatura corrobora com os resultados obtidos no presente estudo.

Outro estudo que corrobora com os resultados é o de Zhou et al (2016) avaliou a reparação óssea após o implante em ratas dos materiais de hidroxiapatita-titânio incorporada com zinco, magnésio e estrôncio. Referente a histologia o grupo que foi aplicado os materiais apresentaram neoformação óssea mais evidentes quando comparado aos grupos que não foram usados os materiais, no período de 90 dias [23]. Isso, vem de forma a dar eficácia que os materiais incorporados com íons metálicos possuem propriedades osteogênicas na reparação óssea.

Portanto, o efeito de osteogênese na formação óssea que contém os materiais incorporados por metais na sua estrutura como o estrôncio e lítio. Deve-se a capacidade que os íons metálicos têm de regular a recepção e detecção do cálcio de forma a induzir a osteogênese pelas células osteoblásticas [24-25].

Figura 7 - Em todos os grupos a neoformação óssea compacta (*) e de aspecto primário ou lamelar, menos acentuada no grupo CC. **A:** Grupo CS. Presença de numerosos ósteons com centro basofílico. **B.** Grupo CC. **C.** Grupo OVX-HAp-Ga. **D.** Grupo OVX-HAp-Ce.

H.E., 10x.



3.4 Análise por Microtomografia

A análise por microtomografia, aos 15 dias do pós-operatório, está representada na figura 8, na qual se observa a reconstrução dos cortes onde o grupo CC que ainda possui pouco osso neoformado disposto de forma concêntrica da periferia para o centro do defeito. Existem áreas com características de reabsorção óssea, quando comparada ao grupo CS, onde o trabeculado ósseo permeia o defeito na tentativa de reparação do mesmo. As imagens do grupo OVX-HAp-Ga apresentaram uma reparação óssea atípica, com trabeculado ósseo mais denso ou iniciando maturação, se estendendo para o centro do defeito. Observa-se restos de material no centro do defeito. O grupo OVX-HAp-Ce se comportou de forma similar ao grupo OVX-HAp-Ga com deposição de tecido ósseo de

forma concêntrica e mais denso que os grupos CC e CS, também apresentou restos de material no defeito.

O resultado de Micro-CT obtido no presente trabalho está em acordo com o trabalho Xian *et al* (2016) que teve como objetivo avaliar o efeito na reparação óssea de defeitos em ratas, após a aplicação de hidroxiapatita modificada com osteoprotogerina. Deste modo, as imagens de Micro-CT revelaram claramente as diferenças entre os animais, mostrando neoformação óssea evidente quando comparado com os animais do controle, após o período de 30 dias dos implantes [26]. Isso, de forma excelente corrobora o resultado revelado pelo presente estudo.

A percentagem da razão BV/TV revela que estatisticamente não teve diferenças relacionadas ao volume de tecido ósseo neoformado entre os grupos CS, OVX-HAp-Ga e OVX-HAp-Ce. No entanto, quando comparado ao grupo CC todos os demais são superiores estatisticamente (Figura 9). Isso se adequa ao objetivo do trabalho uma vez que o grupo CC foi realizado a ovariectomia e os defeitos não receberam os materiais o que fez ter uma menor quantidade de osso neoformado.

Figura 8 - Micro-CT com imagens representativas da neoformação óssea, aos 15 dias do pós-operatório dos grupos CC, OVX-HAp-Ga e OVX-HAp-Ce e CS. Reconstruções axiais.

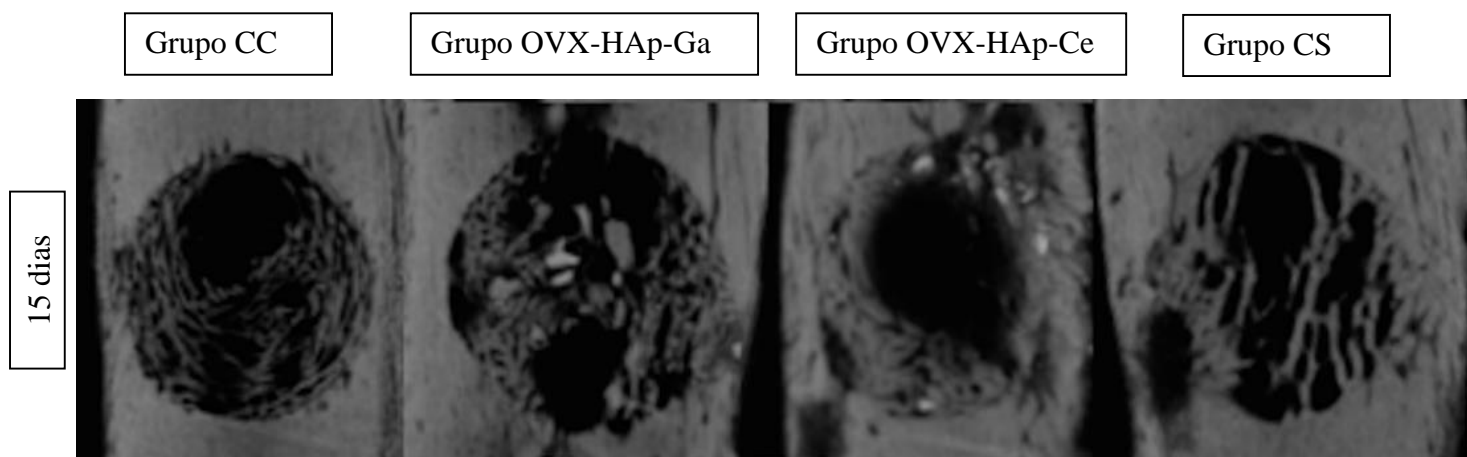
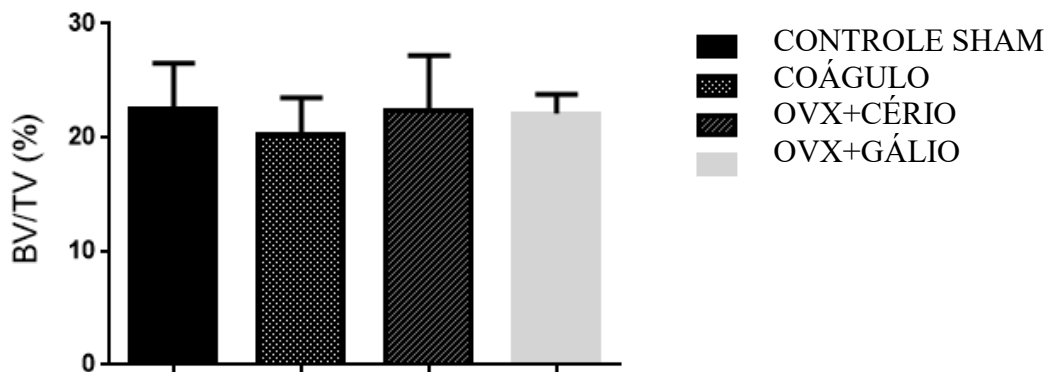


Figura 9 - A análise estatísticas do volume de tecido ósseo neoformado após 15 dias dos implantes (BV/TV).



Na reconstrução das imagens aos 30 dias do pós-operatório, o grupo CC ainda apresenta pouca deposição de tecido ósseo quando comparado aos demais grupos, conforme a Figura 10, isto se justifica pela ocorrência de reabsorção óssea causada pela ovariectomia dos animais deste grupo. Na análise do grupo OVX-Hap-Ga apresentou um volume de tecido ósseo ocupando quase todo o defeito, quando comparado com o grupo CS. O grupo OVX-Hap-Ce se apresentou de forma muito semelhante ao grupo OVX-Hap-Ga também com formação de tecido ósseo em quase todo o defeito. As reconstruções axiais apresentam, no grupo CS, um trabeculado ósseo sem muita densidade e em menor quantidade que os grupos OVX-Hap-Ga e OVX-Hap-Ce.

De acordo com trabalho de Zhou *et al* (2015), que observou a administração de um hormônio paratireoide juntamente com implantes de hidroxiapatita-titânio-estrôncio em defeitos de ratas com osteoporose induzida. As imagens de Micro-CT revelaram claramente a neoformação óssea para os animais com o biomaterial do que para o grupo controle [27]. Isso corrobora com o presente estudo.

A relação entre a razão BV/TV demonstrou por meio de análise estatística que no tempo de 30 dias os grupos CS, OVX-HAp-Ga, OVX-Hap-Ce são estatisticamente superiores ao grupo CC no tocante a neoformação óssea. O volume de tecido ósseo neoformado é maior quando comparado os grupos OVX-HAp-Ga, OVX-HAp-Ce com o grupo CS. No entanto, entre os grupos OVX-HAp-Ga e OVX-HAp-Ce não teve diferença estatística. Isso, revela que os animais que receberam os materiais apresentam efeito estatisticamente superiores quando comparado aos demais grupos. O que possibilita sugerir a aceleração da reparação óssea em implantes com a hidroxiapatita incorporada com íons metálicos cério ou gálio (Figura 11).

Figura 10 - Micro-CT com imagens representativas da neoformação óssea, aos 30 dias do pós-operatório dos grupos CC, OVX-HAp-Ga, OVX-HAp-Ce e CS. Reconstruções axiais.

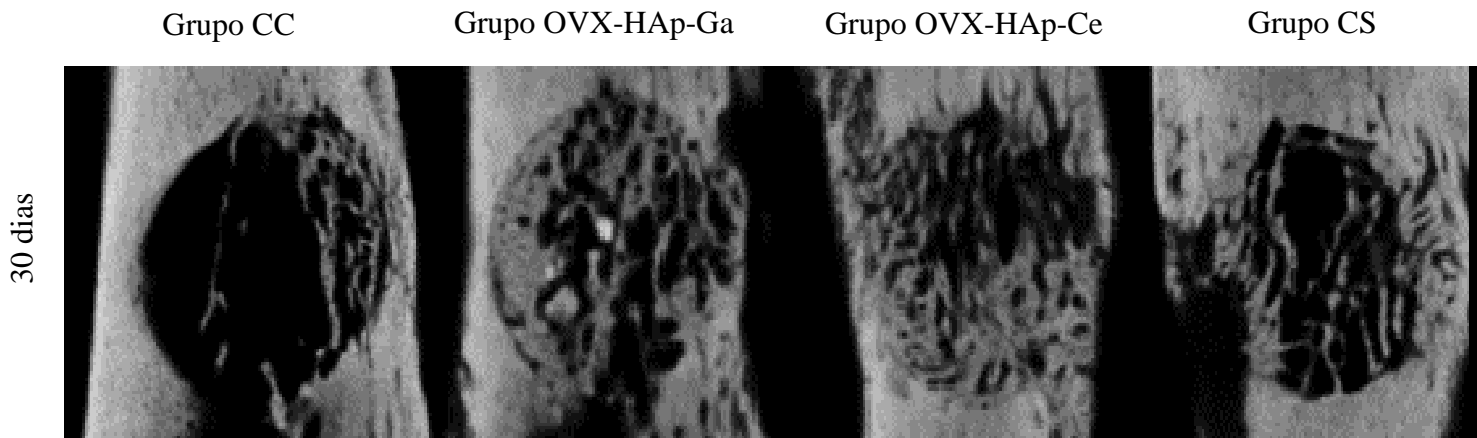
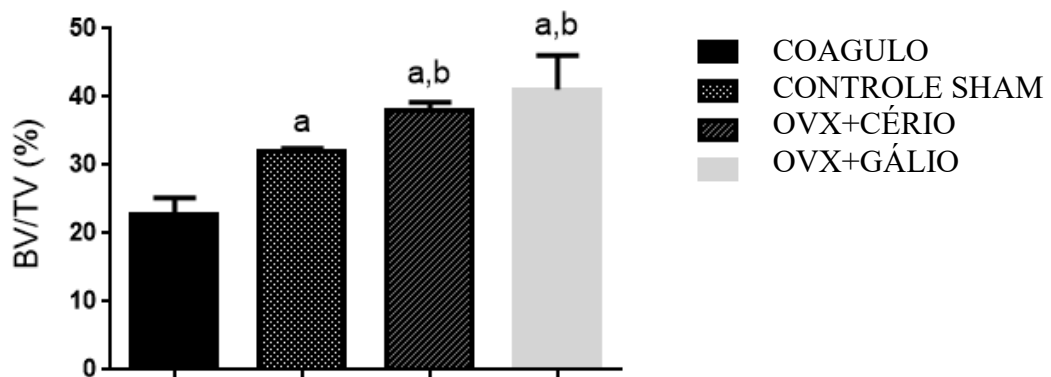


Figura 11 - A análise estatísticas do volume de tecido ósseo neoformado após 30 dias dos implantes (BV/TV).



Portanto, somado as técnicas de caracterizações para avaliar o efeito do material na formação óssea de defeitos em ratas usadas neste trabalho, quais sejam, Raman, Micro-CT e histológico é possível afirmar que a hidroxiapatita incorporadas com os íons gálio ou cério, possuem efeito eficaz para neoformação óssea de defeitos em ratas com osteoporose. Vale ressaltar, que raros trabalhos faz o uso de íons metálicos na matriz de um material para avaliar o efeito no processo de reparação óssea em ratas com osteoporose induzida. Isso, mostra a relevância do presente estudo uma vez que pode ser usado para qualquer reparação óssea.

4. Conclusão

Dentro dos limites desse estudo, conclui-se que a aplicação dos materiais HAp-Ce e HAp-Ga pode acelerar a regeneração óssea de forma que os íons metálicos incorporados na matriz da hidroxiapatita potencializa a neoformação óssea. Assim, os resultados das caracterizações por Raman e histológico, mostraram a formação de novos tecidos ósseos. Para os resultados da micro-CT, tem-se que estatisticamente, ambos os materiais não possuem diferenças significativas na reparação dos defeitos produzidos nos animais. Portanto, os materiais estudados para preenchimentos ósseo, demonstraram-se com características promissoras para aplicações em doenças ortopédicas com redução de volume ósseo ou nas áreas da engenharia tecidual óssea.

5. Referências

- [1] Rasmus, HP.; Marina, R.; Søren, O. Ming, D. Effects of P-15 Peptide Coated Hydroxyapatite on Tibial Defect Repair In Vivo in Normal and Osteoporotic Rats, 2015; 1-14.
- [2] Ministério da Saúde (BR). PORTARIA Nº 224, DE 26 DE MARÇO DE 2014. Dispõe sobre Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose.
- [3] Calori, GM.; Mazza, E.; Colombo, M.; Ripamonti, C. “The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs” *Injury*, vol. 42, supplement 2, pp. S56–S63, 2011
- [4] Kolk, A.; Handschel, J.; W. Drescher, W. et al., “Current trends and future perspectives of bone substitute materials—from space holders to innovative biomaterials,” *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012. vol. 40, no. 8, 706–718.
- [5] Sherman, BP.; Lindley, EM.; Turner, AS. et al., “Evaluation of ABM/P-15 versus autogenous bone in an ovine lumbar interbody fusionmodel,” *European Spine Journal*, 2010. vol. 19, no. 12, 2156–2163.
- [6] Lin, K.; Wu, C.; Chang, J. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. *Acta Biomaterialia*. 2014. 10, 4071-4102
- [7] Supová, M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceramics international*. 2015. 41, 9203-9231.
- [8] Farzadi, A.; Bakshi, F.; Solati-Hashjin, M.; Asadi-Eydivand, M.; Osman, NAA. Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. *Ceramics International*. 2014 40 (4), 6021-6029.
- [9] Kolmas, J., Groszyk, E., & Kwiatkowska-Różycka, D. Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties. *BioMed Research International*, 2014, 1-15.
- [10] Zhao, SF.; Dong, WJ.; Jiang, QH.; He, FM.; Wang, XX.; Yang, GL. Effects of zincsubstituted nano-hydroxyapatite coatings on bone integration with implant surfaces, *Journal Zhejiang University Science*. 2013. B 14 (6) 518–525.
- [11] Yang, F.; Dong, WJ.; He, FM.; Wang, XX.; Zhao, SF.; Yang, GL. Osteoblast response to porous titanium surfaces coated with zinc-substituted hydroxyapatite, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol*. 2012. 113 (3) 313–318.
- [12] Ren, F. Leng. Y.; Xin, R.; Ge, X. Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia*. 2010. 6 (7), 2787–2796.
- [13] Zhao, SF.; Jiang, QH.; Peel, S.; Wang, XX.; He, FM. Effects of magnesium-substituted nanohydroxyapatite coating on implant osseointegration, *Clinical Oral Implants Research*. 2013. 24 (Suppl A100), 34–41.

- [14] Yang, HW.; Lin, MH.; Xu, YZ.; Shang, GW; Wang, RR.; Chen, K. Osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells on strontium-substituted nano-hydroxyapatite coated roughened titanium surfaces, *International Journal Clinical and Experimental Medicine*. 2015. 8 (1), 257–264.
- [15] Li, Y.; Li, Q.; Zhu, S.; Luo, E.; Li, J.; Feng, G.; Liao, Y.; Hu, J. The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats, *Biomaterials*. 2010, 31 (34), 9006–9014.
- [16] Maia, F.; Da Silva J.; Do Amaral, F.; Martin, A.; Lobo, A.; Soares, L. Gical and chemical evaluation of bone with apatite-coated Al₂O₃ implants as scaffolds for bone repair. *Cerâmica*. 2013.59(352): 533–538.
- [17] Alessandra, CSCB.; Margareth, FMD.; Reinaldo, RA.; Hosana, BS.; Kardilândia, MO.; Josué, AR.; Jadson, GD. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. *Revista Brasileira de Ciências e da Saúde*. 2011, v.11, n°2, 209-214.
- [18] Lopes, CB.; Pacheco, MT.; Silveira, L.; Cangussu, MCT.; Pinheiro, AL. The effect of the association of near infrared laser therapy, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with internal rigid fixation: a Raman spectroscopic study. *Journal o Biomedical Materials Research*. 2010. A 94(4):1257–1263.
- [19] Suenaga, H.; Furukawa, KS.; Suzuki, Y.; Takato, T.; Ushida, T. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. *J Mater Sci Mater Med*. 2015. 26(11):254-267.
- [20] Adrielle, MMA.; Lílian, MMF.; Antonio, LMMF.; Danniell, CLF.; Charllyton, LSC.; Vicente, GFV.; José, ZLVS.; Raurrys, AO.; Gustavo, OMG.; Luís, ESS. Evaluation of bone repair after application of a norbixin membrane scaffold with and without laser photobiomodulation (λ 780 nm). *Lasers in Medical Science*. 2018. Volume 33, Issue 7, pp 1493–1504.
- [21] Li, L.; Xiaozhong, P.; Yongbao, Q.; Renchong, W.; Jingli, T.; Xu, C.; Ting, W.; Wenlong, L.; Haobo, P.; Bing, L. Acceleration of bone regeneration by activating Wnt/ β -catenin signalling pathway via lithium released from lithium chloride/ calcium phosphate cement in osteoporosis. *Scientific Reports*. 2017. 11-12.
- [22] Wen, F.; Shifang, Z.; Fuming, H.; Li, L.; Guoli, Y. Influence of Simvastatin-Loaded Implants on Osseointegration in an Ovariectomized Animal Model. *BioMed Research International*. 2015. 1-7.
- [23] Zhou-Shan, T.; Wan-Shu, Z.; Xing-Wen, H.; Wei, L.; Bing-Li, B.; Qiang, Z.; Zheng-Liang, H.; Kai-kai, T.; Hang, L.; Tao, S.; Yang-Xun, L.; Wei, C.; Lei, Y. A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats. *Materials Science and Engineering*. 2016. C 62,226–232.
- [24] Canalis, E.; Hott, M.; Deloffre, P. et al. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone* 1996; 18: 517–523.
- [25] Sunitha, C.; Suresh, BS.; Hari, KVS.; HK, V.; Annie, J. Osteogenic efficacy of strontium hydroxyapatite micro-granules in osteoporotic rat model. *Journal of Biomaterials Applications* 2016, Vol. 31(4) 499–509.
- [26] Xian, L.; Chongyun, B. Hockin, HKX.; Jian. P.; Jing, H.; Ping, W. En L. Osteoprotegerin gene-modified BMSCs with hydroxyapatite scaffold for treating critical-sized mandibular defects in ovariectomized osteoporotic rats. 2018. *Acta Biomaterialia* 42 (2016) 378–388.

[27] Zhou-Shan, T.; Wan-Shu, Z.; Zhou, Q.; Kai-kai, T.; Zheng-Liang, H.; Hong-Ming, X.; Tao, S.; Yang-Xun, L.; Wei, C.; Lei, Y. Intermittent administration of human parathyroid hormone (1–34) increases fixation of strontium-doped hydroxyapatite coating titanium implants via electrochemical deposition in ovariectomized rat femur. *Journal of Biomaterials Applications*. 2016, Vol. 30(7) 952–960.

Considerações Finais

O presente trabalho se preocupou com um dos problemas que mais afeta população idosa no tocante a sua saúde, que é osteoporose. Essa doença é caracterizada pela perda óssea e conseqüentemente pela fragilidade do osso o que pode causar até fraturas. Assim, as buscas na literatura, tais quais, depósitos de patentes, sínteses dos materiais, caracterizações e testes *in vitro* e *in vivo*, para avaliar o efeito dos materiais na reparação óssea em defeitos de ratas com osteoporose induzida, reforçaram que é necessário mais estudo para melhores elucidações nos casos de reparação/regeneração óssea.

É sabido que a hidroxiapatita é amplamente utilizada em aplicações na área da regeneração tecidual e biomédica na forma de revestimentos sobre implantes metálicos, matéria para produção de enxertos do tecido nervoso e ósseo, agentes de liberação de fármaco, proteção de feridas, substratos para cultura celular, imobilização enzimática, revestimentos de próteses ou enxertos ósseos, devido à sua excelente biocompatibilidade, propriedade de osteocondução e similaridade com o componente inorgânico do osso natural, o que foi constatado nesse estudo. Ressalta, que o trabalho ainda permite mais exploração uma vez que existe outras possibilidades de aplicar os materiais associados à polímeros naturais nas formas de hidrogéis, *scaffolds*, compósitos, entre outros.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi obtido pois a neoformação óssea dos animais que receberam os materiais mostrou mais acelerada quando comparada aos demais e, isso, permite sugerir que os materiais são considerados promissores na regeneração óssea.

ANEXO



DECLARAÇÃO CEUA-UESPI


Declaro que, o pesquisador, ANTONIO LUIZ MARTINS MAIA FILHO, deu entrada sob no protocolo o N°0097/2017, *Aplicação de Biotecnologia de um nanocompósito à base de biopolímero natural e fosfato de cálcio, dopado com cério para preenchimento ósseo.*

O mesmo após a análise da Comissão em reunião Extraordinária teve o seguinte parecer:

APROVADO

Data do relatório final: 31 de julho 2021

Teresina, 10 de julho de 2017


Dr. Francisco Araújo
Sub-Coordenador CEUA/UESPI
Portaria N° 1347 - 20/11/14
CRMV - 0415/17



RightsLink®

[Home](#)
[Account Info](#)
[Help](#)


Title: A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats

Logged in as:

Marcos da Silva

[LOGOUT](#)

Author: Zhou-Shan Tao, Wan-Shu Zhou, Xing-Wen He, Wei Liu, Bing-Li Bai, Qiang Zhou, Zheng-Liang Huang, Kai-kai Tu, Hang Li, Tao Sun, Yang-Xun Lv, Wei Cui, Lei Yang

Publication: Materials Science and Engineering: C

Publisher: Elsevier

Date: 1 May 2016

Copyright © 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Dr. Marcos da Silva ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

[printable details](#)

License Number	4510340766648
License date	Jan 15, 2019
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Materials Science and Engineering: C
Licensed Content Title	A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats
Licensed Content Author	Zhou-Shan Tao, Wan-Shu Zhou, Xing-Wen He, Wei Liu, Bing-Li Bai, Qiang Zhou, Zheng-Liang Huang, Kai-kai Tu, Hang Li, Tao Sun, Yang-Xun Lv, Wei Cui, Lei Yang
Licensed Content Date	1 May 2016
Licensed Content Volume	62
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	7
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	English
Original figure numbers	Fig.4
Title of your thesis/dissertation	BIOMATERIAL À BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO, DOPADO COM CÉRIO OU GÁLIO PARA PREENCHIMENTO ÓSSEO
Expected completion date	Jan 2019
Estimated size (number of pages)	113

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

15/01/2019

Rightslink® by Copyright Clearance Center

Requestor Location	Dr. Marcos da Silva Rua Jericó N° 6049 Planalto Bela vista Teresina, PI 64030-100 Brazil Attn: Dr. Marcos da Silva
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Customer VAT ID	BRazil
Total	0.00 USD

ORDER MORE

CLOSE WINDOW

Copyright © 2019 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#), [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Patente de Invenção intitulado “ **COMPOSIÇÃO DE HIDROXIAPATITA DOPADA COM METAIS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS PARA APLICAÇÕES COMO MATERIAIS DE PREENCHIMENTO ÓSSEO**”

NUMERO DO PROCESSO: **BR 10 2018 009777-6.**