



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**BIOMATERIAIS DE HIDROXIAPATITA DOPADA COM CÉRIO OU GÁLIO:
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

EWERTON GOMES VIEIRA

TERESINA-PI

2019



EWERTON GOMES VIEIRA

**BIOMATERIAIS DE HIDROXIAPATITA DOPADA COM CÉRIO OU GÁLIO:
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Química

TERESINA-PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processos Técnicos

- V657b Vieira, Ewerton Gomes.
 Biomateriais de hidroxiapatita dopada com cério ou gálio:
 síntese, caracterização e propriedades biológicas / Ewerton
 Gomes Vieira. --2019.
 146 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro
 de Ciências da Natureza, Programa de Pós-Graduação em
 Química, Teresina, 2019.
 “Orientador: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho.”
1. Biomateriais. 2. Hidroxiapatita dopada - Síntese.
 3. Biocompósitos. I. Silva Filho, Edson Cavalcanti da. II. Título.

CDD 572

ALUNO: EWERTON GOMES VIEIRA

TÍTULO DA TESE: “Biomateriais de hidroxiapatita dopada com gálio ou cério: Síntese, caracterização e propriedades biológicas”

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

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 09/09/2019

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho
(Orientador – Presidente)

Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes
(Universidade Federal do Piauí – UFPI)

Profa. Dra. Carla Verônica Rodarte de Moura
(Universidade Federal do Piauí – UFPI)

Prof. Dr. Hernane da Silva Barud
(Universidade de Araraquara – UNIARA)

Profa. Dra. Maria Gardennia da Fonseca
(Universidade Federal da Paraíba – UFPB)

DATA DA AVALIAÇÃO: 09 de setembro de 2019.

HORÁRIO: 9h00

LOCAL: Auditório Ciências do Materiais, CCN 2, UFPI, Teresina-PI.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^a. Dr^a. Regina Lúcia Ferreira Gomes

DIRETORIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

Prof. Dr. Edmilson Miranda de Moura

VICE-DIRETORIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

Prof. Dr. Jefferson Cruz dos Santos Leite

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Prof. Dr. José Milton Elias de Matos

DEDICATÓRIA

“Dedico esta Tese de Doutorado à toda a minha família, em especial aos meus pais Tânia e Evaldo, ao meu irmão Anderson, à minha avó Mundica, ao meu avô Zeca Bento (in memoriam), ao meu tio Pedro, à minha eterna e amada Ivina Bahury, a todos os meus professores de Graduação e Pós-Graduação, aos amigos de infância e, em especial, ao Professor Edson Cavalcanti.”

AGRADECIMENTOS

- 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, Evaldo e Tânia por todo o carinho, por todo amor, apoio, esforço e dedicação.
- Ao meu irmão Anderson Gomes Vieira (mano).
- Aos meus avós Zeca Bento (*in memoriam*) e Vó Mundica.
- Ao meu tio Pedro Lopes.
- A minha querida e amada Ivina Bahury.
- A toda família Bahury pela torcida e por toda demonstração de carinho.
- Aos meus amigos laboratório e de vida Dr. Marcos Pereira da Silva e Prof. Ricardo Barbosa de Sousa.
- Aos meus amigos de graduação e pós-graduação Gleisson Leal, Guilherme Mota, Roosevelt Delano, Wiury Chaves, Alan Ícaro, Wallon Veras, Régis Casimiro, Thátilla Vanessa e Carla Adriana.
- Aos meus amigos de infância Lucas BP, Bob Silveste, Tailane Lemos, Zé Henrique, Pedro Neto, Felipe Chilikim, Tkescim, Kléber Ratim, Paulo Orelha, Kayo Zaydan, Jordanno Wallyson, Rafael Magno e Thiago Doido.
- Ao Departamento de Biofísica e Fisiologia, em especial aos Professores Marcos, João Paulo, Anderson, Acácio, aos amigos Maísa, Esmeralda, Irlene, Adriana e Paulo Camilo.
- Ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV.
- À Universidade Federal do Piauí por me proporcionar todas as minhas conquistas pessoais, profissionais e acadêmicas.
- À Universidade Estadual do Piauí, em especial a todos os professores do Departamento de Química.
- À Universidade de Araraquara (UNIARA) pela colaboração e auxílio com os experimentos.
- Ao Instituto Federal do Piauí (IFPI) pela disponibilidade das realizações do ensaio mecânico.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho por todos os ensinamentos.

- A professor Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Fialho Vasconcelos pelo grande apoio e orientações.
- Aos professores Dr. Anderson Nogueira Mendes, Profa. Dra. Carla Verônica Rodarte de Moura, Prof. Dr. Hernane da Silva Barud e a Profa. Dra. Maria Gardennia da Fonseca por todas as suas contribuições dadas a esse trabalho.

***“I remember the promise that I have made to myself
The kid I was has grown up, but all his dreams stayed the same
The souvenirs of his words linger inside of my head
It's like crystal-clear”***

(Música: Voyager, Banda: Novelists)

Biomateriais de hidroxiapatita dopada com cério ou gálio: Síntese, caracterização e propriedades biológicas

RESUMO

Biomateriais têm sido cada vez mais utilizados como produtos de restauração e de preenchimento de tecidos ósseos. A hidroxiapatita dopada (dop-HA) e suas associações à fármacos ou a polissacarídeos, podem ser uma dessas alternativas. Nesse estudo, a síntese das dop-HAs ocorreu via método da precipitação química, utilizando como dopantes os íons gálio (Ga) e cério (Ce). As formulações dos biomateriais associadas entre a Ga-HA e um fármaco (clorexidina - CLX) e a Ce-HA e um polissacarídeo (quitosana - QT) foram fabricadas. O biocompósito Ga-HA/CLX, na forma de micropartículas funcionalizadas, foi obtido via adsorção sólido-líquido variando a concentração da CLX (0,20; 0,80 e 1,20% v/v). Para esse material, foram realizados cálculos computacionais, através de cálculos DFT (*Density Functional Theory*), para verificar a termodinâmica favorável das interações entre a cerâmica e o antisséptico. Já o compósito Ce-HA/QT, na forma de um *scaffold*, foi manufacturado a partir da liofilização de um hidrogel obtido via complexação polieletrólítica, sem a utilização de um agente químico reticulante e o mesmo teve as suas propriedades mecânicas (módulo de Young, tensão máxima e deformação) avaliadas segundo a ASTM Standards D 2990-01. As partículas de HAs e os biomateriais foram caracterizados por diferentes técnicas, seguida da avaliação de algumas das suas propriedades biológicas (atividade antibacteriana via contato direto e viabilidade celular *in vitro* via método colorimétrico). Por meio da espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e espectroscopia por energia dispersiva (EDS) foi possível identificar a presença dos íons dopantes e calcular razão Ca/P que variou entre 1,50 a 1,72. Os materiais apresentaram eficiência inibitória contra as cepas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os níveis de viabilidade celular (fibroblastos) foram superiores a 80%; logo, os materiais sintetizados nesse estudo foram classificados como sendo não-tóxicos. Os resultados corroboraram a classificar os biocompósitos fabricados como potenciais materiais a serem aplicados na área da engenharia tecidual óssea.

Palavras-chave: hidroxiapatita, dopagem, biocompósito, antisséptico, *scaffold*, reticulação polieletrólítica, atividade antibacteriana, biocompatibilidade.

Gallium or cerium doped hydroxyapatite biomaterials: synthesis, characterization and biological properties

ABSTRACT

Biocomposites have been increasingly applied as orthopedics materials in the area of bone tissue engineering. Doped-hydroxyapatite (dop-HA) and its associations with drugs or polysaccharides may be one such alternative source. In this research, the synthesis of dop-HAs occurred via the chemical precipitation method. Gallium (Ga) and cerium (Ce) were used as doping ions. After synthesis and characterization of the hydroxyapatites, formulations of a Ga-HA/antiseptic (chlorhexidine - CLX) and Ce-HA/polysaccharide (chitosan - CS) composites were obtained. The Ga-HA/CLX biocomposite, functionalized hydroxyapatite particles, was obtained by adsorption at the liquid–solid interface. Three chemical concentration ranges of the CLX were chosen (0.20, 0.80, and 1.20% v/v). The Ce-HA/CS composite, in the form of a scaffold, was manufactured from the freeze-dried of a hydrogel obtained by a polyelectrolytic complexation without the use of a chemical cross-linking agent. The particles and biocomposites were characterized by DR-X, FT-IR, TGA/DTG, XPS, SEM, and EDS. Then, the materials had their antibacterial properties and in vitro cell viability studied. Through XPS and EDS analyzes it was possible to identify the presence of the doping ions and the Ca/P ratios ranging from 1.50 to 1.72. The materials exhibit antibacterial effect against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The cell viability percentages were of more than 80% and the materials were classified as non-toxic. The computational thermodynamic analysis (Density Functional Theory) was used to study the interactions between Ga-HA and CLX and, finally, the Ce-HA/CS scaffold had its mechanical properties (Young's modulus, stress and strain) evaluated according to ASTM Standards D 2990-01. Therefore, the final results classify the composites obtained as possible materials that can be applied in the area of bone tissue engineering.

Keywords: hydroxyapatite, doping, biocomposite, antiseptic, scaffold, polyelectrolyte complexation, antibacterial activity, biocompatibility.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – Modificação da hidroxiapatita para aplicações biomédicas: um estudo prospectivo

Figura 1. Conceitos em ET e áreas afins.....	23
Figura 2. Projeção da célula unitária da hidroxiapatita.....	33
Figura 3. Comparação da parede celular das bactérias gram-negativa e gram-negativa.....	35

CAPÍTULO 2 – Um novo biocompósito não tóxico baseado na hidroxiapatita dopada com gálio e clorexidina com propriedades antibacterianas: um estudo experimental e teórico

Figura 1. Esquema representativo das metodologias e procedimentos utilizados para a avaliação estrutural e biológica do compósito Ga-HA/CLX.....	57
Figura 2. (a) Padrão de DRX para HA e Ce-HA, (b) refinamento de Rietveld para Ga-HA e (c) representação das células unitárias das hidroxiapatitas obtida nesse estudo.....	58
Figura 3. (a) Espectro de EDS para a Ga-HA e (b) linhas de emissão relativas aos elétrons ejetados dos orbitais 3d do Ga.....	60
Figura 4. Porcentagem atômica quantitativa (%atômica) dos componentes elementares que constituem a amostra Ga-HA. A quantificação foi realizada utilizando o <i>software</i> CasaXPS.....	61
Figura 5. Isoterma de adsorção da CLX na superfície da hidroxiapatita.....	62
Figura 6. (a) DRX para Ga-HA e Ga/CLX (b) FTIR para Ga-HA e Ga/CLX, (c) e (d) curva TG para Ga-HA e Ga/CLX, (e) composição química qualitativa por e (f) FE-SEM para o compósito Ga-HA/CLX.....	65
Figura 7. Imagens das placas do ensaio antibacteriano via MCD: (a e b) controles positivos (solução salina); (c e d) efeito inibitório dos pós HA e Ga-HA e (e e f) efeito inibitório dos materiais HA/CLX-1,20 e Ga-HA/CLX-1,20.....	67
Figura 8. Resultados da viabilidade celular <i>in vitro</i> dos materiais sintetizados nesse estudo. Os resultados são expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle negativo (C-): DMEM + FBS a 10% v/v. O grupo controle	

positivo (C+) como referência de efeito citotóxico é composto por: DMEM + FBS 10% v/v + DMSO 30% v/v. Análise estatística: ANOVA ONE WAY e o teste post-hoc. * $p \leq 0,05$68

Figura 9. Esquema representativo das estruturas de HA e clorexidina.....71

Figura 10. Configurações mais favoráveis termodinamicamente para as duas configurações calculadas entre a interação da CLX com a HA.....72

Figura 11. (a) Espectros de FT-IR-teórico calculado da HA, HA/CLX e CLX isolados, (b) espectros de FT-IR-experimentais HA, HA/CLX e CLX isolados e (c) espectros de FT-IR teórico das $\text{conf}(\text{Int}_1)$, $\text{conf}(\text{Int}_2)$, espectro experimental do composto HA/CLX e espectro experimental da HA.....73

CAPÍTULO 3 – Síntese e caracterização da hidroxiapatita dopada com cério: investigação das suas propriedades antibacteriana e de citotoxicidade.

Figura 1. Padrão de DRX das amostras da (a) HA e da (b) Ce-HA.....88

Figura 2. Refinamento de Rietveld para o pó de (a) HA e (b) Ce-HA obtidos pelo MSPQ. (c) Representação das células unitárias das hidroxiapatitas obtidas nesse estudo.....89

Figura 3. Espectros FTIR para (a) HA e (b) Ce-HA e sua ampliação entre a região $500\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ correspondendo a (c) HA e (d) Ce-HA.....92

Figura 4. (a) Espectro de EDS para a HA, (b) espectro de EDS para a Ce-HA, (c) espectro de XPS para a HA, (d) linhas de emissão relativas ao O, Ca e P que compõem a hidroxiapatita, (e) espectro de XPS para a Ce-HA e (f) linhas de emissão relativas ao dublete de elétrons ejetados dos orbitais 3d do Ce.....93

Figura 5. Porcentagem atômica quantitativa (%atômica) dos componentes elementares que constituem a amostra Ce-HA. A quantificação foi realizada utilizando o software CasaXPS.....96

Figura 6. (a) Efeito inibitório contra as cepas E. coli (ATCC 25992) e S. aureus (ATCC 25923) e (b) imagens das placas do ensaio antibacteriano via MCD das partículas de hidroxiapatita sintetizadas.....100

Figura 7. Resultados da viabilidade celular *in vitro* dos materiais sintetizados nesse estudo. Os resultados são expressos como porcentagem de viabilidade celular em

relação ao grupo controle negativo (C-): DMEM + FBS a 10% v/v. O grupo controle positivo (C+) como referência de efeito citotóxico é composto por: DMEM + FBS 10% v/v + DMSO 30% v/v. Análise estatística: ANOVA ONE WAY e o teste post-hoc. * $p \leq 0,05$102

CAPÍTULO 4 – Preparação de um *scaffold* baseado na hidroxiapatita dopada com cério/quitosana para aplicações em engenharia tecidual óssea

Figura 1. <i>Scaffold</i> à base de quitosana e hidroxiapatitas (HA e Ce-HA) obtido após processo de liofilização.....	114
Figura 2. FTIR da (a) Ce-HA, (b) SCF-HA, (c) SCF-Ce-HA e (d) quitosana.....	118
Figura 3. TGA da amostra (a) SCF-Ce-HA e curva TGA ampliada das amostras (b) HA e Ce-HA, (c) TGA da QT e DTG para a (d) QT e para o (e) SCF-Ce-HA.....	119
Figura 4. Possível interação entre a hidroxiapatita e os grupos químicos da quitosana.....	121
Figura 5. MEV para (a) Ce-HA, (b-d) SCF-Ce-HA e (e)* imagem 3D do SCF-Ce-HA. (*Para melhor perspectiva visual, os autores recomendam que os leitores utilizem óculos tipo ciano e vermelho).....	123
Figura 6. EDS do <i>scaffold</i> formulado com QT/Ce-HA.....	124
Figura 7. Distribuição do tamanho dos poros do SCF-Ce-HA.....	124
Figura 8. Estudo <i>in vitro</i> da perda de massa do <i>scaffold</i> em meio PBS pelo seguinte período de tempo: 1, 7, 14, 21 e 28 dias.....	126
Figura 9. Resultados de proliferação celular <i>in vitro</i> para (a) os materiais precursores e suas formulações para o período de 24 h e (b) proliferação celular para o material SCF-Ce-HA em três períodos de tempo. Os resultados são expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle negativo (α -MEM + FBS). Grupo controle positivo como referência de efeito citotóxico (α -MEM + FBS + DMSO). Análise estatística: ANOVA ONE WAY e o teste post-hoc. * $p \leq 0,05$ e **= $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo 72 h.....	130

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – Modificação da hidroxiapatita para aplicações biomédicas: um estudo prospectivo

Tabela 1. Quantidade de publicações encontradas no banco de dados Scopus.....	29
Tabela 2. Relação dos materiais sintetizados em alguns artigos estudados e suas aplicações.....	31
Tabela 3. Títulos e objetivos dos artigos citados na Tabela 2.....	32
Tabela 4. Quantidade de patentes encontradas nos bancos de patentes EPO, USPTO e INPI.	39
Tabela 5. Características das patentes encontradas no EPO.....	41
Tabela 6. Biomateriais a base de hidroxiapatita encontrando no mercado.....	43

CAPÍTULO 2 – Um novo biocompósito não tóxico baseado na hidroxiapatita dopada com gálio e clorexidina com propriedades antibacterianas: um estudo experimental e teórico

Tabela 1. Razão Ca/P calculada via XPS para os pós de HA e Ga-HA sintetizados.....	61
Tabela 2. Resultados da incorporação da CLX calculados utilizando a Equação 1.....	62
Tabela 3. Resultados dos efeitos inibitórios dos compósitos contra cepas bacterianas.....	66
Tabela 4. Energia eletrônica total (0 K) e variação da energia de Gibbs (298,15 K) em unidade arbitrária (u.a.), energia de interação (ΔE_{int} ou ΔG_{int}) e estabilidade relativa (E.R.) das n-configurações obtidas em kcal mol ⁻¹	71

CAPÍTULO 3 – Síntese e caracterização da hidroxiapatita dopada com cério: investigação das suas propriedades antibacteriana e de citotoxicidade.

Tabela 1. Parâmetros de rede obtidos após refinamento de Rietveld para as células unitárias da Ce-HA.....	90
--	----

Tabela 2. Posições dos picos de XPS para os pós HA e Ce-HA sintetizados nesse estudo.....95

Tabela 3. Acoplamento spin-orbita de acordo a energia de ligação para as espécies de cério identificadas pelo XPS.....95

Tabela 4. Razão semi-quantitativa da HA e Ce-HA obtida por EDS em comparação com razões Ca/P disponíveis na literatura.....97

Tabela 5. Razão Ca/P calculada via XPS para os pós de HA e Ce-HA sintetizados.....97

CAPÍTULO 4 – Preparação de um *scaffold* baseado na hidroxiapatita dopada com cério/quitosana para aplicações em engenharia tecidual óssea

Tabela 1. Tamanho médio dos poros e área de porosidade do SCF-Ce-HA.....125

Tabela 2. Comparação entre módulos de compressão e elasticidade da SCF-Ce-HA, osso esponjoso e osso cortical.....127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MEM: *Minimum Essential Medium*

Å: ångström

ΔE_{int} : Energia de interação

ΔG_{int} : Energia livre de Gibbs

θ : Teta

η : Efeito inibitório

χ^2 : Fator de convergência

λ : Comprimento de onda em nanômetro

%atômica: Porcentagem atômica quantitativa

%molar: Porcentagem molar quantitativa

ATCC: *American Type Culture Collection*

ASTM: *American Society for Testing and Materials*

BET: Brunauer-Emmett-Teller

BHI: *Brain heart infusion*

C₍₋₎: Controle negativo

C₍₊₎: Controle positivo

Ca/P: Razão cálcio/fósforo

CDHA: Hidroxiapatita deficiente em cálcio

Ca-def HA: Hidroxiapatita deficiente em cálcio

Ce-HA: Hidroxiapatita dopada com cério

Ce-HA/QT: compósito de hidroxiapatita dopada com cério e quitosana

C_f: Concentração final

C_i: Concentração inicial

CIF: *Crystallographic Information File*

CLX: Clorexidina

conf(Int₁): Configuração de interação favorável 1

conf(Int₂): Configuração de interação favorável 2

CPE: Complexo polieletrólítico

CS: Chitosan

DFT: *Density Functional Theory*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidade óptica

Dop: Dopagem, dopante
DRX: Difração de raio-X
EDS: Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X
E.L.: Energia de ligação
E.R.: Estabilidade relativa
EPO: *European Patent Office*
eV: elétron-volt
FBS: *Fetal bovine serum*
FHA: fluorohidroxiapatita
FT-IR: Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier
Ga-HA: Hidroxiapatita dopada com gálio
Ga-HA/CLX: Compósito de hidroxiapatita dopada com gálio e clorexidina
GSAS: *General Structure Analysis System*
HA: Hidroxiapatita
HA/CLX: Compósito hidroxiapatita pura e clorexidina
HRTEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução
ICSD: *Inorganic Crystal Structure Database*
INPI: Instituto Nacional da Propriedade Intelectual
ISO: *International Organization for Standardization*
JCPDS-ICCD: *Joint Committee on powder Diffraction Standard – International Center of Diffraction Data*
MCD: Método do contato direto
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FEG: Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
M_f: Massa final do *scaffold*
M_i: Massa inicial do *scaffold*
MPa: Megapascal
MSPQ: Método da suspensão-precipitação química
MTT: Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
N₁: média aritmética das unidades formadoras de colônia das placas controle
N₂: média aritmética das unidades formadoras de colônia das placas testes
nm: nanômetro
PBS: tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*)
PCM: Modelo Contínuo Polarizável (*Polarizable Continuum Model*)

Qe: Quantidade de CLX incorporada

QT: Quitosana

Rwp: *weighted*-profile R-factor

SCF-Ce-HA: Compósito Ce-HA/QT na forma de *scaffold*

SCF-HA: Compósito HA/QT na forma de *scaffold*

SBF: Fluido corporal simulado

TGA/DTG: Análise Termogravimétrica/Análise Diferencial Termogravimétrica

UFC: Unidade Formadora de Colônia

USPTO: *United States Patent and Trademark Office*

UV-Vis: Espectrofotometria Ultravioleta-Visível

V: Volume

VESTA: *Visualization for Eletronic and Structural Analysis*

XPS: Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	18
REFERÊNCIAS.....	19
PRODUÇÕES ACADÊMICAS DURANTE O DOUTORADO	21
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA.....	22
Resumo	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. BUSCAS NA LITERATURA	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1 Pesquisa de artigos no banco de dados Scopus	28
3.2 Busca nos principais bancos de patentes	38
4. CONCLUSÃO	43
5. REFERÊNCIAS.....	44
CAPÍTULO 2: ESTUDO EXPERIMENTAL E TEÓRICO	48
Resumo	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. METODOLOGIA	51
2.1 Materiais e reagentes.....	51
2.2 Síntese do compósito hidroxiapatita/clorexidina.....	51
2.3 Caracterização.....	53
2.3 Atividade antibacteriana via método do contato direto	54
2.4 Viabilidade celular	55
2.5 Análise Estatística.....	56
2.6 Detalhes Computacionais.....	56

3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1	Caracterização da HA, Ga-HA e do compósito	58
3.2	Caracterização dos compósitos e estudo da adsorção	61
3.3	Estudos do efeito inibitório via MCD e efeitos de citotoxicidade	66
3.4	Estudo teórico da interação entre a HA e CLX	70
4.	CONCLUSÃO	74
5.	REFERÊNCIAS	75
	CAPÍTULO 3: ESTUDO EXPERIMENTAL	80
	Resumo	80
1.	INTRODUÇÃO	81
2.	METODOLOGIA	83
2.1	Materiais	83
2.2	Síntese das hidroxiapatitas	83
2.2.1	Sínteses da hidroxiapatita pura (HA)	83
2.2.2	Sínteses da hidroxiapatita dopada com Ce	83
2.3	Caracterizações	84
2.3.1	Difratometria de Raios X (DRX) e refinamento de Rietveld	84
2.3.2	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	84
2.3.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplado a espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	85
2.3.4	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS)	85
2.4	Estudos das propriedades biológicas	85
2.4.1	Atividade antibacteriana via método do contato direto	85
2.4.2	Viabilidade celular	86

2.5 Análise Estatística.....	87
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
3.1 Caracterização via DRX e refinamento de Rietveld	88
3.2 Identificação do Ce e cálculo da razão Ca/P	91
3.3 Efeito inibitório contra cepas bactérias	99
3.4 Efeito da viabilidade celular	101
4. CONCLUSÃO	103
5. REFERÊNCIAS.....	103
CAPÍTULO 4: ESTUDO EXPERIMENTAL	110
Resumo	110
1. INTRODUÇÃO.....	111
2. PARTE EXPERIMENTAL	113
2.1 Materiais.....	113
2.2 Preparo dos <i>scaffolds</i>	114
2.3 Caracterizações	115
2.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	115
2.3.2 Análise termogravimétrica (TG)	115
2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplado a espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	115
2.4 Estudo de degradação <i>in vitro</i>	115
2.5 Ensaio mecânico de compressão	116
2.6 Teste de viabilidade celular	116
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
3.1 Caracterização dos <i>scaffolds</i>	118

3.2 Degradação <i>in vitro</i> e propriedades mecânicas	125
3.3 Estudo de citotoxicidade	128
4. CONCLUSÃO	131
5. REFERÊNCIAS.....	132
CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
PESPECTIVAS FUTURAS	139
ANEXO.....	140

APRESENTAÇÃO

Os biomateriais são definidos como uma classe de compostos que induzem uma resposta apropriada ao interagir com moléculas biologicamente ativas e os organismos vivos (CHEN; LIU, 2016). Os biocompósitos ortopédicos e dentários têm sido estudados e utilizados como uma alternativa de restauro e preenchimento dos tecidos duros afetados ou danificados (ALJABO et al., 2016). Esses biomateriais e suas formulações como biocompósitos à base de fármacos ou polissacarídeos, podem possuir um conjunto de propriedades mecânicas e biológicas adequadas que permitam exercer funções que auxiliam, substituem e estimular o crescimento desses tecidos (GOMES et al., 2019; SIDDIQUI; PICKERING; MUCALO, 2018).

Nesse contexto, a hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é uma biocerâmica muito usada em processos de reparação tecidual ósseo por ser a principal constituinte da parte inorgânica do osso, além de apresenta propriedades osteoindutoras e osteogênicas (DACULSI et al., 2013; KATTIMANI; KONDAKA; LINGAMANENI, 2016; WANG et al., 2019).

Diante disso, a literatura expõe trabalhos que ampliam ou modificam as propriedades biocompatíveis já conhecidas da HA e a associação dessa com outros materiais, seja pela incorporação de íons metálicos, de fármacos ou de polissacarídeos, formulando biocompósitos que possuam propriedades de inibir o crescimento de organismos patogênicos e potencializar as suas propriedades citocompatíveis (KURTJAK et a., 2016; LEI et al., 2017; SOUZA et al., 2011).

Assim, a presente Tese de Doutorado foi desenvolvida em 4 Capítulos. Em seu Capítulo 1, apresenta-se uma revisão da literatura com a hidroxiapatita dopada com gálio ou cério, suas associações para formulações como biocompósitos e áreas de aplicação da medicina ou odontologia regenerativa. Buscou estudar artigos e patentes que abordassem temas relacionados a essa biocerâmica e algumas das suas aplicações nos ramos da engenharia tecidual, biomédicas e avaliação das suas propriedades de atividade antibacteriana.

No Capítulo 2 é apresentado um estudo científico-teórico sobre a síntese da hidroxiapatita dopada com gálio (Ga-HA) e a obtenção de um biocompósito constituído por Ga-HA e um antisséptico, a clorexidina (CLX). A fabricação desse biocompósito foi realizada via adsorção superficial sólido-líquido. Após caracterização, os biocompósitos tiveram as propriedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus*

e *Escherichia coli* avaliadas, assim como os seus efeitos citotoxicidade *in vitro*. Finalmente, através de cálculos DFT (*Density Functional Theory*), verificou-se a termodinâmica favorável entre a interação da Ga-HA e a CLX.

No Capítulo 3, o artigo científico descreve a síntese da hidroxiapatita dopada com cério (Ce-HA), obtida por meio do método da suspensão-precipitação química. A cerâmica foi caracterizada por DRX, FTIR, XPS e EDS. Após constatação da fase, ocorreu a avaliação de algumas das suas propriedades biológicas. Esse último estudo contou com a avaliação da inibição das cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e o teste de citotoxicidade via método calorimétrico.

No Capítulo 4, buscou-se investigar os efeitos da interação polieletrólítica entre a Ce-HA e a quitosana (QT) com a finalidade de se produzir um material com características porosas e estruturadas tridimensionalmente (*scaffold*). Os biomateriais estruturados foram caracterizados por FTIR, TG, MEV, EDS, ensaio de degradação em PBS e ensaio mecânico. Após as caracterizações físico-químicas e a descoberta dos seus módulos mecânicos. Por meio de ensaio de citotoxicidade, o material obteve viabilidade celular foi superior a 80%.

REFERÊNCIAS

ALJABO, A. et al. Development of dental composites with reactive fillers that promote precipitation of antibacterial-hydroxyapatite layers. **Materials Science and Engineering C**, v. 60, p. 285–292, 2016.

CHEN, F. M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 86–168, 2016.

DACULSI, G. et al. Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes. **Irbm**, v. 34, n. 4–5, p. 346–348, 2013.

GOMES, D. S. et al. A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine. **Cerâmica**, v. 65, n. 374, p. 282–302, 2019.

KATTIMANI, V. S.; KONDAKA, S.; LINGAMANENI, K. P. Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. **Bone and Tissue Regeneration Insights**, v. 7, p. BTRI.S36138, 2016.

KURTJAK, M. et al. Biocompatible nano-gallium/hydroxyapatite nanocomposite with antimicrobial activity. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 11, 2016.

LEI, Y. et al. Strontium hydroxyapatite/chitosan nanohybrid scaffolds with enhanced

osteoinductivity for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 72, p. 134–142, 2017.

SIDDIQUI, H. A.; PICKERING, K. L.; MUCALO, M. R. A review on the use of hydroxyapatite- carbonaceous structure composites in bone replacement materials for strengthening purposes. **Materials**, v. 11, n. 10, p. 1–32, 2018.

SOUZA, C. A. S. DE et al. Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 310–318, 2011.

WANG, Q. et al. Experimental and simulation studies of strontium/fluoride-codoped hydroxyapatite nanoparticles with osteogenic and antibacterial activities. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, n. June, p. 110359, 2019.

PRODUÇÕES ACADÊMICAS DURANTE O DOUTORADO

➤ ARTIGOS PUBLICADOS:

- SANTOS, M. V. B.; ROCHA, L. B. N.; VIEIRA, E., G.; OLIVEIRA, A. L.; LOBO, A. O.; DE CARVALHO, M. A. M; OSAJIMA, J. A.; SILVA-FILHO, E. C. Development of Composite Scaffolds Based on Cerium Doped-Hydroxyapatite and Natural Gums - Biological and Mechanical Properties. **Materials**, v. 12, n. 15, p. 1–21, 2019.
- SOUSA, R. B.; VIEIRA, E. G.; MENEGUIN, A. B.; SABIO, R. M.; FURTINI, J. A. O.; SILVA FILHO, E. C. Recent advances in methods of synthesis and applications of bacterial cellulose/calcium phosphates composites in bone tissue engineering. **International Journal of Advances in Medical Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 34–42, 2018.

➤ CAPÍTULO DE LIVRO:

- VIEIRA, E. G.; VIEIRA, T.W.S.; SILVA, M.P.; SANTOS, M.V.B.; BRITO, C.A.R.S.; BEZERRA, R.D.S.; FIALHO, A.C.V.; OSAJIMA, J.A.; SILVA FILHO, E.C. **Tuned Hydroxyapatite Materials for Biomedical Applications. Biomaterials**, Physics and Chemistry, p. 87–104, 2018.

➤ PATENTE DE INVENÇÃO:

- “Composição de hidroxiapatita dopada com metais com propriedades antimicrobianas para aplicações como materiais de preenchimento ósseo”. (NÚMERO DO PROCESSO: BR 10 2018 009777-6).

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

Modificação da hidroxiapatita para aplicações biomédicas: um estudo prospectivo

Resumo

A hidroxiapatita destaca-se entre os biomateriais devido as suas propriedades de osteocondução e osteoindução, sendo apropriada para ser utilizada em enxertos ósseos. A sua alta estabilidade estrutural permite diversas aplicações biomédicas, dentre elas, a utilização como formulações de compósitos a base de polissacarídeos e as substituições catiônicas que ocorrem por meio da dopagem do material por metais, que podem melhorar as características biológicas, como aperfeiçoar a ação do combate a infecções bacterianas *in situ*. Este estudo abrange um levantamento de artigos e patentes, sem restrição de tempo e com restrição de tempo de 2007 a 2017 e atualizada em 2019, que contenham informações sobre a hidroxiapatita nos ramos da engenharia tecidual, biomédicas, dopada com metais e suas propriedades de atividade antibacteriana. o banco de dado utilizado nas pesquisas foram o SCOPUS, para os artigos e EPO, USPTO e INPI, para os bancos de patentes. Os resultados apontaram que a utilização da hidroxiapatita e suas formulações na forma de biocompósitos está relacionada a aplicações nas áreas da engenharia tecidual e regeneração óssea, sendo a dopagem, uma alternativa para melhoramento das propriedades antibacterianas frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Palavras-Chave: Hidroxiapatita, *scaffold*, dopagem, atividade antibacteriana.

1. INTRODUÇÃO

A engenharia tecidual (ET) é a ciência que envolve as aplicações das engenharias e das ciências da saúde para assistir e acelerar à regeneração e reparos dos tecidos defeituosos e danificados no organismo humano. Ela visa criar e aprimorar novas terapias e o desenvolvimento de novos biomateriais que possam ser utilizados para restauração, melhoramento ou prevenção do agravamento da função tecidual comprometida como, por exemplo, em situações com grande perda de integridade tecidual resultante de traumas, deformidades do desenvolvimento e doenças (OLIVEIRA et al., 2010; TABATA, 2009).

Na perda ou comprometimento do tecido ósseo tem sido investigado e utilizado de diferentes maneiras vários biomateriais naturais ou sintéticos como: polímeros, cerâmicas e metais ou seus compósitos como uma alternativa de substituição. A principal alternativa para a sua substituição tecidual óssea danificada ou perdida é o enxerto ósseo autógeno. Sendo essa a primeira alternativa a ser empregada para a regeneração do tecido ósseo devido as suas propriedades osteogênicas (KALAMBETTU e DHARMALINGAM, 2014).

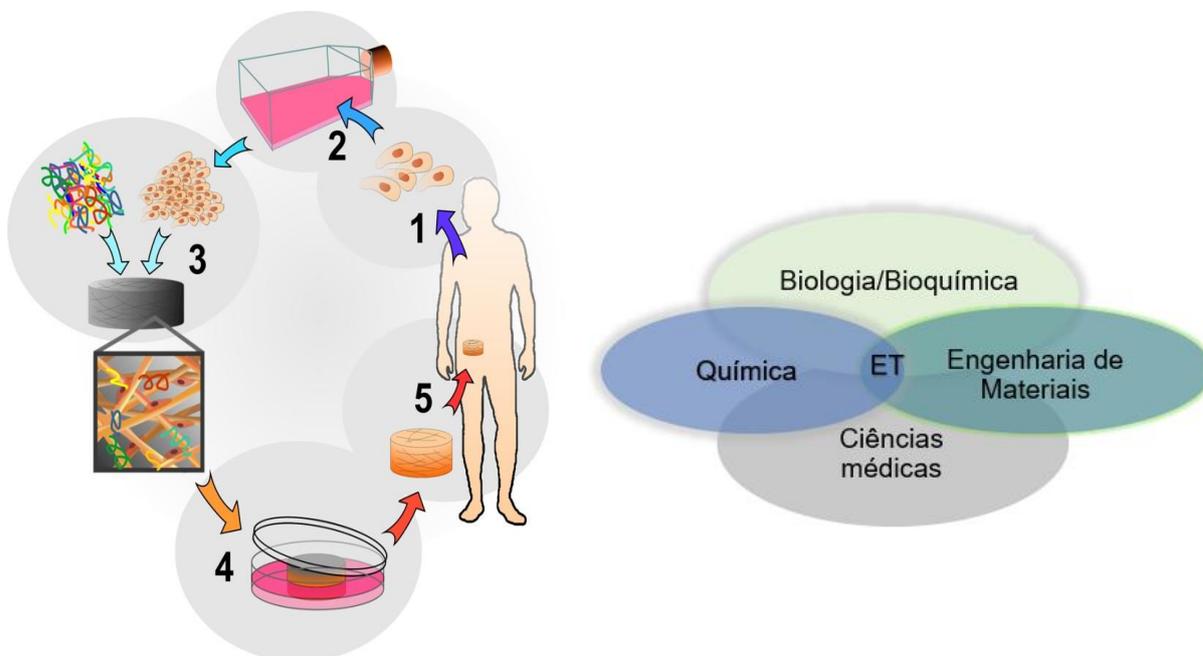


Figura 1. Conceitos em ET e áreas afins.

No entanto, os enxertos têm disponibilidade limitada, devido a necessidade de procedimentos cirúrgicos com possíveis infecções locais, rejeição pelo organismo transplantado e reabsorções progressivas do material. Como resultado, pesquisas científicas estão desenvolvendo novos biomateriais para a sua substituição. Assim, os

enxertos sintéticos podem ser uma interessante alternativa, por apresentarem características intrínsecas, como biocompatibilidade e similaridade química com os tecidos ósseos dos seres vivos, aliadas com suas propriedades de osteoindução¹ e osteocondução² (BEST et al., 2008; DOROZHKIN, 2010; KAWABATA et al., 2011; GUILLAUME et al., 2017; RYABENKOVA et al., 2017).

As biocerâmicas são a classe de cerâmica usada para reparação e substituição de partes doentes e danificadas dos sistemas músculo esqueléticas. Elas são os materiais mais amplamente utilizados na classe de traumas como os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), o fosfato octacálcico ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), o pirofosfato de cálcio dihidratado ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e o β -tricálcio fosfato ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (KAWACHI et al., 2000).

Os fosfatos de cálcio são classificados de acordo com uma relação em mol de cálcio e fósforo Ca/P que varia entre 0,5 e 2,0. A HA, o integrante mais utilizado em aplicações biomédicas para os fosfatos, é o principal componente do osso e é conhecida por sua alta afinidade celular e tecidual. A HA 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 (LIN et al., 2014; SADAT-SHOJAI et al., 2013; SUPOVÁ, 2015).

Esse biomaterial possui a capacidade de estabelecer ligações químicas com o tecido vivo do osso devido à sua estrutura e composição química que são semelhantes a apatita encontrada no esqueleto humano. Adicionalmente, a biocompatibilidade e bioatividade da HA pode promover a proliferação dos osteoblastos que são formadoras de novas células tecido ósseo. Outros estudos com esses materiais abrangem também as áreas da biologia, química, engenharia dos materiais, entre outras (GAYATHI et al., 2018; AN et al., 2012; OYEFUSI et al., 2014).

¹ A osteoindução é a capacidade de induzir a célula mesenquimal indiferenciada, presente na área receptora, a se transformar em uma célula formadora de osso, um osteoblasto.

² A osteocondução é a capacidade que o biomaterial de enxerto tem de servir de arcabouço para a migração de células ósseas, e está relacionada principalmente aos materiais mineralizados, sendo boa parte deles comercializada sob o nome genérico de hidroxiapatita.

Os *scaffolds* tridimensionais porosos a base de HAp são os materiais ideais mais utilizados na modelação, reconstrução e formação dos novos tecidos ósseos. Os *scaffolds* adequam de maneira indireta o tecido e, assim, favorecem a diferenciação, migração e proliferação tecidual ou a formação de osteoblásticas (FOOK et al., 2010). No entanto, não é possível utilizar a HA sozinha como *scaffolds* devido a falta de algumas propriedades mecânicas adequadas. A combinação de polímeros biodegradáveis e materiais inorgânicos bioativos acabam por melhorar as propriedades mecânicas, biocompatibilidade e afinidades celulares dos componentes individuais (AO et al., 2017).

Os biocompósitos à base de biopolímeros naturais estão sendo estudados e associados a HA. Isto se deve ao comportamento biocompatível e biodegradável de alguns desses polímeros naturais. Esta geração de biomateriais combina ainda propriedades bioativas que mimetizam a função natural do osso, acionando mecanismos de regeneração de tecidos *in vivo* (KIKUCHI et al., 2004; SWETHA et al., 2010). Os biocompósitos HA-biopolímeros que muitas vezes se assemelha bastante a posição e estrutura dos tecidos mineralizados, proporciona excelentes propriedades mecânicas, além de propriedades biológicas favoráveis, assim, tornando-se um candidato ideal para engenharia de tecidos, bem como aplicações ortopédicas e dentárias (IZAWA et al., 2014).

Os biopolímeros, como o alginato, o ácido hialurônico, fibroína de seda, quitosana, celulose e as gomas naturais, são ótimas alternativas para melhorar a biocompatibilidade da HA quando esses estão em associação. Esses biocompósitos são modelos potenciais para a mineralização de HA, porque a sua superfície aniônica pode ligar os íons Ca^{2+} , além de controlar a nucleação e o crescimento do cristal reduzindo a energia interfacial entre o cristal e a superfície. Deste modo, vários materiais compostos por HA podem ser preparados utilizando polissacáridos aniônicos na forma de *scaffolds* para aplicações biomédicas e engenharia de tecido ósseo (IZAWA et al., 2014; HADAVI et al., 2017).

Em muitos procedimentos cirúrgicos ocorre a formação de uma interface química do tipo biomaterial/osso e, conseqüentemente, a fixação biológica, na qual a estrutura óssea viva penetra no espaço livre do biomaterial, provocando assim, a fixação permanente do osso. Porém, esses procedimentos podem apresentar problemas de infecções bacterianas muitas vezes difíceis de serem controladas

durante o período pós-operatório, e, conseqüentemente, o uso excessivo de antibióticos que podem não fornecer proteção suficiente, levam a uma possível perda do material ósseo e a podem gerar cepas resistentes de bactérias que são difíceis de tratar (NAGANO et al., 2014; NAMBA et al., 2013; RADOVANOVIC et al., 2014).

Contudo, os mecanismos de defesa ativados pelo sistema imunológico podem ser reforçados pela introdução de agentes antibacterianos que possuam interação biológica com o biomaterial. Uma das alternativas é a capacidade de substituição dos íons da HA, por meio da dopagem, por outros que possuam propriedades antibacterianas como a introdução de íons: Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , SeO_3^{2-} , Sr^{2+} , Ce^{3+} , Ga^{3+} , entre outros. (FERRARIS et al., 2014; KOLMAS et al., 2014; MISHRA et al., 2014; MORAIS et al., 2014).

Os sítios onde estão os íons que compõem a HA (Ca^{2+} , PO_4^{2-} , OH^-) podem ser ocupados por íons de tamanho e carga semelhante. Esta capacidade de incorporação de íons através da dopagem é uma alternativa que se baseia no fato de que a introdução de pequenas quantidades de alguns íons pode causar alterações que trazem melhoramentos nos aspectos biológicos, físico-químicos, propriedades mecânicas e antimicrobianas do material (AINA et al., 2012; DOROZHKIN, 2009; FARZADI et al., 2014; KANNAN et al., 2008; KOLMAS et al., 2014; SHEPHERD et al., 2012).

Outra alternativa é a associação de fármacos a esses materiais com a finalidade de funcionalizar as suas características antibacterianas. A utilização de alguns antissépticos, tais como clorexidina, cloroxilenol e polihexametileno biguanida, agentes antimicrobianos orgânicos que demonstraram eficácia e podem ser uma alternativa para evitar o risco de resistência aos antibióticos (KOZLOVSKY et al., 2016). A clorexidina (CLX), ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10}$) é um exemplo desse tipo de agente. A CLX é um biocida com ação inibitória contra uma ampla variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativa que pode ser utilizado para potencializar a HA contra infecções *in situ* dos microorganismos (DUTT et al., 2014).

A sua principal aplicação é na odontologia como um agente tópico, geralmente encontrado em produtos de higiene oral, produtos para tratamento de doença periodontal e vernizes. Estudos sugerem a utilização da CLX como agente antibacteriano em implantes ósseos, sendo mais uma alternativa para a prevenção de infecções localizadas (BELLIS, et al. 2016; SANTOS et al., 2016; SOUZA et al., 2011).

Assim, este estudo teve por objetivo apresentar uma busca de artigos e patente de invenções tecnológicas, no qual buscou-se reunir informações sobre hidroxiapatita e algumas das suas aplicações na área da engenharia tecidual, dopagem com íon gálio ou cério, funcionalizações com o antisséptico clorexidina e polissacarídeos para aplicações biomédicas.

2. BUSCAS NA LITERATURA

O trabalho foi realizado através da busca de artigos científicos e patentes. Foram utilizados artigos do banco de dado Scopus e as palavras-chave utilizadas foram: *hydroxyapatite*, *scaffold*, *composite*, *polysaccharide*, *doped*, *gallium*, *cerium*, *antiseptic* e *“antimicrobial activity”*. Para a busca de patentes de inovação tecnológica, a pesquisa ocorreu nos seguintes banco de dados de patentes: *European Patent Office (EPO)*, *United States Patent and Trademark Office (USPTO)* e o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. Tanto os acessos de artigos e patentes ocorreram no mês de maio de 2017 e foram atualizados em agosto de 2019, utilizando os mesmos campos de pesquisa e as mesmas palavras-chave da pesquisa de artigos, porém para a pesquisa na base INPI utilizou-se as palavras também em português. As pesquisas, de artigos e patentes, foram realizadas de duas formas: sem restrição de tempo e com restrição de tempo de 2009 a 2019. As pesquisas das palavras-chave foram baseadas em informações contidas nos campos resumos, palavras-chave e títulos para as buscas dos trabalhos relacionados aos temas em estudo e essas palavras-chave foram usadas tanto em inglês como, também, em português, dependendo do banco de dados pesquisados, além de serem combinadas entre si e utilizado aspas para as buscas de termos/palavras compostas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Pesquisa de artigos no banco de dados Scopus

A investigação da quantidade de artigos publicados revelou que a medida em que as palavras vão sendo combinadas, observa-se uma diminuição da quantidade de publicações encontradas e, quando combinadas entre si, verificou-se que em alguns casos não há publicação relacionada com essas palavras. Os resultados utilizando as palavras-chave separadas e combinadas: *hydroxyapatite*, *scaffolds*, *polysaccharide*, *doped*, *gallium*, *cerium*, *antiseptic*, *antibacterial activity*, e *composite* estão dispostos na Tabela 1.

Na Tabela 1, comparando-se o tempo de publicação dos artigos e analisando os dados buscados, sem a limitação do tempo com os dados restritos no período entre 2009 a 2019, foram observados que a maior parte das publicações se concentra neste intervalo de tempo. Isto revela que os estudos sobre o material vêm ganhando destaque ao longo da última década.

Observe que para as combinações *hydroxyapatite and antiseptic and antibacterial activity and composite* 01 artigo foi encontrado. Já para as combinações *hydroxyapatite and doped and antiseptic and antibacterial activity and composite* e *hydroxyapatite and scaffold and and composite and polysaccharide and doped and antiseptic and “antibacterial activity”*, não foram encontrados nenhuns trabalhos científicos relacionados.

O trabalho intitulado “*Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity*”, oriundo das combinações *hydroxyapatite and antiseptic and antibacterial activity and composite*, tem como objetivo a utilização do antisséptico clorexidina (CLX) como funcionalizador da superfície da hidroxiapatita pura. Os autores desenvolveram um biomaterial via método da adsorção, além de avaliar as suas atividades antibacterianas e citotóxicas. Em seus resultados, os autores constataram que cerca de 8,6 µg de CLX/m de HA mostraram níveis de atividade de inibição antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* e nos testes de viabilidade celular, constataram que o material foi considerado não tóxico (SOUZA et al., 2011).

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

Palavras-chave	Publicações (1960-2019)	Publicações (2009-2019)
<i>Hydroxyapatite</i>	57.455	29.964
<i>Scaffold</i>	127.866	81.265
<i>Polysaccharide</i>	155.584	101.526
<i>Doped</i>	399.255	221.943
<i>Gallium</i>	228.605	87.551
<i>Cerium</i>	82.966	51.470
<i>Antibacterial activity</i>	121.972	79.252
<i>Antiseptic</i>	12.791	4.855
<i>Hydroxyapatite and scaffold</i>	6.607	5.266
<i>Hydroxyapatite and scaffold and polysaccharide</i>	104	87
<i>Hydroxyapatite and scaffold and polysaccharide and doped</i>	2	1
<i>Hydroxyapatite and doped</i>	1.713	1.492
<i>Hydroxyapatite and doped and cerium</i>	35	30
<i>Hydroxyapatite and doped and gallium</i>	10	8
<i>Hydroxyapatite and doped and antibacterial activity</i>	141	137
<i>Hydroxyapatite and antiseptic</i>	23	17
<i>Hydroxyapatite and antiseptic and antibacterial activity and composite</i>	1	1
<i>Hydroxyapatite and doped and antiseptic and antibacterial activity</i>	0	0
<i>Hydroxyapatite and doped and antiseptic and antibacterial activity and composite</i>	0	0

Fonte: Adaptado de VIERIA et al., 2018, p. 91.

Quando se utilizou as expressões *hydroxyapatite and scaffold and polysaccharide* foram encontrados o total de 104 trabalhos na busca geral (1960-2019) e ao se limitar o tempo, ou seja, entre 2007 a 2019, o total de 87 trabalhos foram relacionados e, desse total, 74 trabalhos se tratam relativamente de pesquisas científicas no formato de artigos experimentais. Ao se levar em consideração o número de trabalhos relacionados com as palavras-chave citadas anteriormente, cerca de

aproximadamente 83,65% foram publicados na última década. Ou seja, o tema relacionado vem ganhando maior atenção na última década por parte da comunidade científica mundial.

Ao se combinar as palavras-chave: *hydroxyapatite* and *scaffold* and *polysaccharide* and *doped*, 02 artigos foram encontrados, mas somente um desses se trata efetivamente de pesquisa científica experimental, o outro artigo em questão se trata de uma revisão. O artigo intitulado “*Bioactivation of knitted cellulose scaffolds by strontium*” foi publicado no ano de 2008, por H. Brandt, F.A. Muller e P. Greil, pesquisadores do Departamento de Ciências dos Materiais da Universidade de Erlangen-Nuremberg, Alemanha. O artigo aborda a utilização das propriedades do estrôncio (Sr^{2+}) no tratamento contra a osteoporose, sua atividade anabólica e de não reabsorção.

O material utilizado foi na forma *scaffold* que foram preparados utilizando uma composição contendo HA dopada com Sr^{2+} mais celulose. O estudo avaliou a cinética de liberação do Sr^{2+} durante exposição estática a fluido corporal simulado para avaliar a precipitação de hidroxiapatita carbonatada óssea sob condições que simulassem a parte inorgânica do plasma sanguíneo humano.

Assim, ao se avaliar as palavras-chave: *hydroxyapatite* and *doped* and *gallium* ou *hydroxyapatite* and *doped* and *cerium* que formam o material de partida para a composição dos biocompósitos desenvolvidos, a partir do estudo dos artigos encontrados para as combinações, pode-se extrair informações importantes como, por exemplo, método de síntese, os microrganismos utilizados em testes antibacterianos, além dos objetivos das pesquisas que, no geral, é de desenvolver um material com atividade antibacteriana e estimular a formação novos tecidos ósseos a partir da síntese de hidroxiapatitas dopadas.

O gálio (Ga), por exemplo, é atualmente considerado não-tóxico em organismos vivo e, mesmo que os sais e complexos de gálio não tenham função fisiológica conhecida no corpo humano, algumas de suas características permitem a sua interação com processos celulares e proteínas biologicamente importantes, especialmente as que atuam no metabolismo do ferro (MELNIKOV et al., 2019). Outros estudos avaliados, apresentam a associação do Ce com a HA dopada a fim de melhorar as propriedades biológicas e conferir maior atividade antibacteriana ao material. Por exemplo, Hu et al., (2014), sugerem que o Ce participa na regulação da

migração e diferenciação osteogênica de células estromais mesenquimal da medula óssea (BMSCs) (HU et al., 2014). A Tabela 2 apresenta alguns desses artigos e traça uma relação da utilização dos materiais sintetizados e suas aplicações e a Tabela 3 mostra seus respectivos objetivos.

Tabela 2. Relação dos materiais sintetizados em alguns artigos estudados e suas aplicações.

Material	Método de síntese	Aplicação	Autor/Ano de publicação
Compósito de hidrogel de HA a base de goma xantana	<i>Soaking process</i>	Engenharia tecidual óssea	Izawa et al., 2014.
Scaffold a base de HA e goma arábica	Co-precipitação e dissolução	Engenharia tecidual óssea	Hadavi et al., 2017.
Scaffold nanofibroso de algodão a base de celulose e nano-HA	Eletrofiliação	Engenharia tecidual óssea	Ao et al., 2017.
Fosfato de cálcio amorfo dopado com gálio	Sol-gel	Inibição de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e Engenharia tecidual óssea	Yang et al., 2016.
Hidroxiapatita dopada com gálio	Suspensão coloidal	Aplicações em implantes ortopédicos	Melnikov et al., 2019
<i>Revestimento de colágeno e hidroxiapatita sobre a superfície da liga Ti-6Al-4V</i>	<i>Self-assembly</i> e nucleação.	Aplicações em implantes ortopédicos	Hu et al., 2018
Gálio revestindo a hidroxiapatita	Suspensão coloidal	Cirurgias Ortopédicas	Melnikov et al., 2009
Hidroxiapatita co-substituída por estrôncio e cério	Irradiação de micro-ondas	Inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Gopi et al., 2014.
Compósito de hidroxiapatita reforçada com vidro dopado com cério	Co-precipitação	Inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Morais et al., 2015.
Hidroxiapatita dopada com cério (IV)	Co-precipitação	Inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Ciobanu et al., 2016
Hidroxiapatita e fluorohidroxiapatita co-substituída por zircônia e cério	Sol-gel	Inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Sanyal et al., 2016

Fonte: Adaptado de VIERIA et al., 2018, p. 92.

Tabela 3. Títulos e objetivos dos artigos citados na Tabela 2.

Título	Autores	Objetivo dos artigos
<i>Mineralization of hydroxyapatite upon a unique xanthan gum hydrogel by an alternate soaking process</i>	Izawa et al., 2014.	Produzir um hidrogel que servirá como molde orgânico para mineralização biomimética do cálcio no tecido ósseo.
<i>Novel calcified gum Arabic porous nano-composite scaffold for bone tissue regeneration</i>	Hadavi et al., 2017.	Verificar os efeitos proporcionados do <i>scaffold</i> à base polissacarídeo/nano-HA sobre o mecanismo de ossificação <i>in vitro</i> .
<i>Fabrication and characterization of electrospun cellulose/nano-hydroxyapatite nanofibers for bone tissue engineering</i>	Ao et al., 2017.	Desenvolver um processo eficaz para a fabricação de um nanocompósito a base de celulose/nano-HA/algodão através do processo <i>electrospinning</i> .
<i>Novel gallium-doped amorphous calcium phosphate nanoparticles: Preparation, application and structure study</i>	Yang et al., 2016.	Desenvolver um fosfato de cálcio amorfo dopado com gálio com propriedades antibacterianas e biologicamente ativas
<i>Evaluation of in vitro toxicity of hydroxyapatite doped with gallium</i>	Melnikov et al., 2019	Avaliar a toxicidade <i>in vitro</i> em células de macaco da hidroxiapatita dopado com gálio
<i>Sectioning Studies of Biomimetic Collagen-Hydroxyapatite Coatings on Ti-6Al-4V Substrates Using Focused Ion Beam</i>	Hu et al., 2018	<i>Síntese de um revestimento biomimético de colágeno-hidroxiapatita sobre a superfície da liga Ti-6Al-4V que possa simular propriedades do osso humano.</i>
<i>Gallium-containing hydroxyapatite for potential use in orthopedics</i>	Melnikov et al., 2009	Síntese de um material cerâmico contendo gálio revestindo a hidroxiapatita para ter seu uso voltado as cirurgias ortopédicas
<i>Strontium, cerium co-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, characterization, antibacterial activity towards prokaryotic strains and in vitro studies</i>	Gopi et al., 2014.	Sintetizar hidroxiapatita dopada com estrôncio e cério para melhorar as aplicações biomédicas e estudar a atividade antibacteriana contra as bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , mostrando a influência da concentração de Sr ²⁺ e Ce ³⁺ sobre o tamanho, a morfologia, a pureza, cristalinidade, atividade antibacteriana e capacidade de ligação com osso.
<i>Novel cerium doped glass reinforced hydroxyapatite with antibacterial and osteoconductive properties for bone tissue regeneration</i>	Morais et al., 2015.	Desenvolver um compósito de hidroxiapatita reforçada com vidro dopado com cério, e estudar suas propriedades físico-químicas, biológicas e biomecânicas.
<i>New cerium(IV)-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Preparation and characterization</i>	Ciobanu et al., 2016.	Preparar nano pós de hidroxiapatita dopada com cério (IV) por meio do método de coprecipitação. Avaliar os efeitos da substituição do cálcio por cério, sobre a morfologia, a pureza, cristalinidade, tamanho de cristalito e capacidade antibacteriana.
<i>Structural and antibacterial activity of hydroxyapatite and fluorohydroxyapatite co-substituted with zirconium-cerium ions</i>	Sanyal et al., 2016.	Estudar os efeitos da co-substituição do cálcio por íons zircônio (Zr) e cério (Ce) na estrutura da hidroxiapatita e da fluorohidroxiapatita, sobre o tamanho de cristalito, morfologia, cristalinidade, estudos térmicos e quanto à atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .

Fonte: Adaptado de VIEIRA et al., 2018, p. 93.

Nota-se que alguns desses trabalhos listados nas Tabelas 2 e 3 utilizam estudos da hidroxiapatita dopado com íons gálio e cério, bem como a combinação desse com outros metais como estrôncio e zircônia e avaliam a sua capacidade de inibição bacteriana. Essa dopagem é possível graças a estrutura química da HA que pode facilmente acomodar uma variedade de substituintes catiônicos e aniônico.

A Figura 2 apresenta a projeção da célula unitária (hexagonal) da hidroxiapatita quando projetada para baixo do eixo c [001], mostra um grupo OH no centro da estrutura e a posição dos dois tipos de cátions de cálcio: cálcio 1 (Ca(1)) e cálcio 2 (Ca(2)) para melhor entendimento de como é possível ocorrer a substituição dos íons da HAp. Os átomos de cálcio Ca(1) estão localizados nas extremidades de um sextavado célula unitária, enquanto que os átomos de cálcio Ca(2) estão em uma posição mais interna ao redor do grupo OH. O grupo de fosfato (PO_4^{3-}) é o maior íon que constrói as células unitárias (UDHAYAKUMAR et al., 2016).

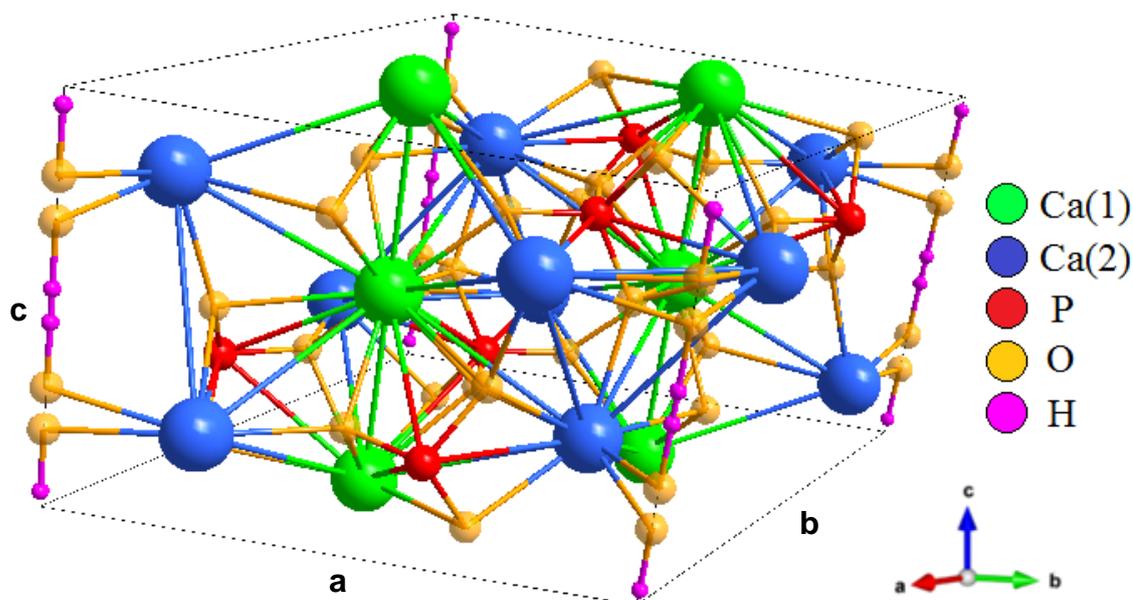


Figura 2. Projeção da célula unitária da hidroxiapatita.

Fonte: Disponível em VIEIRA et al., 2018, p. 94.

A pesquisa no banco de dados dos artigos, os números revelaram que a maioria dos trabalhos desenvolvem materiais para futuras aplicações destes na área de engenharia tecidual, porém notou-se com a utilização das palavra-chave selecionadas, que existe uma baixa taxa de aplicações desses materiais voltados para a área da engenharia tecidual e biomédica. Em outras palavras, os materiais estudados possuem a característica de inibição do crescimento bacteriano, porém, as

buscam mostraram a não utilização desses biomateriais organizados na forma de biocompósitos ou *scaffold*.

Os artigos selecionados e relatados nas Tabelas 2 e 3 abordam como principal objetivo a dopagem da HA e o melhoramento das suas propriedades de inibição de crescimento bacteriológico. Na sua maioria, os trabalhos que objetivam tal finalidade, abordam as metodologias utilizadas para as sínteses e caracterizações dos materiais como, também, os ensaios biológicos utilizados para a investigação da propriedade antibacteriana que esses materiais possuem. Porém, não deixam claro como funciona o mecanismo de atuação desses materiais junto as bactérias.

Uma das causas que leva a falha dos implantes convencionais é a infecção causada por bactérias. Diante disso, os trabalhos científicos estudados buscaram melhorar as propriedades biológicas da HA através da dopagem, visto que esse procedimento pode agregar à HA propriedades que estimulem a neoformação óssea³ e atuação como agente antibacteriano. As bactérias, principais causadoras das infecções, são classificadas em gram-positivas e gram-negativas (ROANE et al., 2009).

Essa classificação é dada segundo diferenças na arquitetura da parede celular. A parede celular gram-positiva consiste de uma camada espessa de peptidoglicano, enquanto que a parede celular da gram-negativa apresenta estrutura e composição da membrana mais complexa. A gram-negativa possui a camada de peptidoglicano mais fina e a superfície externa da célula possui uma membrana formada por proteínas, lipopolissacarídeos e fosfolipídios chamada de membrana externa (ROANE et al., 2009).

O espaço entre o peptidoglicano e a membrana externa é conhecido como espaço periplasmático, este espaço apresenta em alguns pontos enzimas e proteínas e desempenha várias funções fisiológicas, a Figura 3 mostra a comparação entre as composições das paredes celulares de bactérias gram-positiva e gram-negativa (ROANE et al., 2009).

É possível observar na Figura 3 que a superfície da bactéria gram-positiva é coberta, principalmente, por polissacarídeos neutros e ácidos, grande número de diferentes proteínas, ácidos teicóicos, já a membrana externa das gram-negativas apresenta uma distribuição irregular de lipídeos sobre as faces externa e interna, onde

³ Processo de reconstrução do defeito tecidual ósseo

a face externa contém todos os lipopolissacarídeos, enquanto a face interna contém a maioria dos fosfolipídios (SILHAVY et al., 2010).

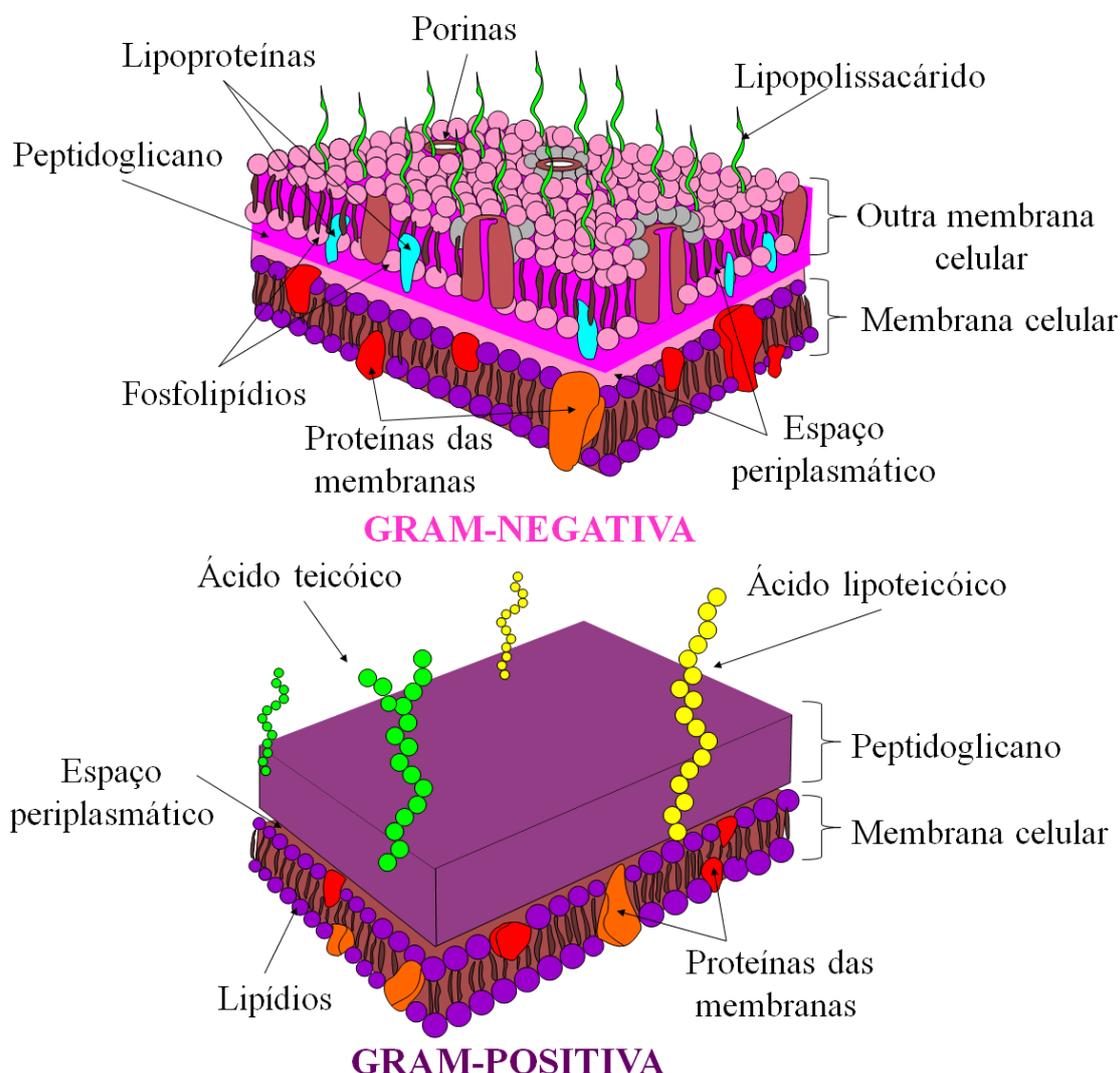


Figura 3. Comparação da parede celular das bactérias gram-negativa e gram-positiva.

Fonte: Disponível em VIEIRA et al., 2018, p. 95.

Dentre a classe de bactérias testadas, destacam-se as gram-positivas como sendo o tipo mais estudado nos trabalhos. Das bactérias gram-positivas estudadas, a *Staphylococcus aureus* ganhou mais destaque entre os artigos pesquisados. A *S. aureus* é um patógeno excepcionalmente bem adaptado que pode sobreviver em condições diferentes, sem exigências nutricionais ou ambientais particulares.

As infecções causadas por *S. aureus* aumentaram ao longo dos anos, sendo uma das principais causas de infecções bacterianas em humanos a nível mundial. Nas

últimas décadas, o tratamento dessas infecções tornou-se mais difícil principalmente pelo fato de a *S. aureus* desenvolver mecanismos de resistência aos antibióticos usados nos tratamentos (BAPTISTA et al., 2016; STEFANI et al., 2015). Enquanto que para as gram-negativas, a mais testada foi a *E. coli*, que apesar do número reduzido na causa deste tipo de infecção, é um grupo relevante na prática clínica, apresentando uma maior dificuldade em seu tratamento (HSIEH et al., 2009).

Gopi et al. (2014), produziram nanopartículas de hidroxiapatita pura (nano-HA), de hidroxiapatita dopada com estrôncio (Ca/Sr-HA), hidroxiapatita co-substituída com estrôncio e cério (Ca/Sr/Ce-HA) em diferentes concentrações de cério (0,05, 0,075 e 0,1 mol/L) através do método de irradiação de micro-ondas. Todos os materiais sintetizados foram investigados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX), de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG), análise dispersiva de raios-X de energia (EDS), microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) e análise termogravimétrica (TG).

A atividade antibacteriana das nanopartículas obtidas foi avaliada contra duas estirpes procariotas, *E. coli* e *S. aureus*, utilizando o método de difusão de disco. Os resultados obtidos revelaram que a amostra Ca/Sr/Ce-HAp com a concentração de 0,1 mol/L de cério apresentou maior atividade antibacteriana frente as duas estirpes testadas quando comparado com os resultados obtidos com a HA e Ca/Sr/HAp, Gopi et al. (2014) afirmam que o Ce^{3+} desempenhou um papel vital no aumento da atividade antibacteriana da nanopartícula sintetizada. A fim de avaliar a bioatividade das amostras, fizeram testes utilizando o fluido corporal simulado (SBF) durante vários dias e observaram que os íons Sr^{2+} e Ce^{3+} contribuíram para a formação de apatita concluindo que a nanopartícula Ca/Sr/Ce-HA sintetizada pode ser um biomaterial promissor para aplicações biomédicas.

No trabalho de Morais et al. (2015), foi desenvolvido um compósito de hidroxiapatita reforçada com vidro dopado com cério (GR-HAp-Ce). As fases formadas no material sintetizado foram identificadas com o auxílio das técnicas microscopia eletrônica de varredura acoplada a energia dispersa secundária (MEV-EDS e DRX), além da fase da hidroxiapatita o material apresentou as fases β -TCP e α -TCP, a incorporação do metal também foi confirmada. Os autores concluíram que a presença do cério no compósito GR-HAp-Ce proporcionou um efeito antibacteriano eficaz contra

bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis*, porém, esse efeito não foi observado para a bactéria *P. aeruginosa*. Além de investigar a atividade antibacteriana avaliou-se também as propriedades osteocondutoras do material, o qual foi realizado utilizando células osteoblásticas humana e mostrou que a adição de cério não afetou a viabilidade celular do material e que o mesmo apresentou boa capacidade osteocondutora.

Kurtjak et al. (2016), desenvolveram um novo biomaterial na forma de nanocompósitos constituído de nanopartículas de hidroxiapatita dopada com gálio. O material foi obtido utilizando o método da emulsificação por ultrassom. Os referidos pesquisadores avaliaram as propriedades de material contra *P. aeruginosa* e também a sua citotoxicidade utilizando as células de fibroblastos de pulmão de humanos e de ratos, além de fazerem um estudo da liberação de Ga^{3+} aos meios biológicos estudados.

O material foi caracterizado por DRX, FTIR, UV-Vis, MEV e TEM. A técnica para avaliar os efeitos antibacterianos do material foi o método do contato direto e os efeitos da viabilidade celular foi por meio do ensaio de MTT. Os autores concluíram que o material possui uma alta taxa de atividade antibacteriana e biocompatibilidade, sendo classificados como um biomaterial bastante promissor que poderá ter seu uso futuro em aplicações biomédicas (engenharia de tecidos, cicatrização de feridas, reparo de fraturas ósseas, prevenção de infecções durante a implantação).

Usando o método de co-precipitação, Ciobanu et al. (2015), sintetizaram nanopartículas de hidroxiapatita pura e hidroxiapatita dopada com cério (Ce-HA) em diferentes concentrações no intervalo de 1% a 25% (com variação de 5%) e buscaram avaliar sua propriedade antibacteriana. Os efeitos da substituição de Ca^{2+} por Ce^{3+} e seus efeitos na morfologia, pureza, cristalinidade, tamanho de cristalito e capacidade antibacteriana dos pós de hidroxiapatita foram investigados por meio das técnicas microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada com análise de raios-X (EDX), difração de raios X em pó (DRX), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise de área de superfície Brunauer-Emmett-Teller (BET) confirmando a formação da hidroxiapatita e a presença de íons Ce^{4+} e Ce^{3+} em sua rede cristalina. Os materiais dopados obtiveram melhores resultado de inibição bacteriana indicando que a presença do íon contribuiu para a

inibição das bactérias, porém os nano-pós de Ce-HA foram mais eficazes contra a bactéria *E. coli* do que contra *S. aureus*.

Sanyal e Raja (2016), fizeram um estudo sobre efeito da co-substituição de Zr e Ce na estrutura da HA e da fluorohidroxiapatita (FHA), pelo método sol-gel. A obtenção das amostras foi confirmada com os espectros de FTIR e DRX, observou-se que mesmo com o aumento da concentração dos íons Zr^{4+} e Ce^{3+} a formação da fase HA foi mantida. Os materiais co-substituídos apresentaram melhores resultados de atividade antibacteriana quando comparados a hidroxiapatita pura, sendo que o material com maior concentração de cério apresentou os melhores resultados de inibição bacteriana contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Todos os artigos encontrados relatam que a presença íon cério na estrutura da hidroxiapatita melhorou a atividade antibacteriana e também conferiu ao material uma melhora na bioatividade e pode contribuir para a formação de novos tecidos ósseos.

3.2 Busca nos principais bandos de patentes

Os resultados das pesquisas executadas nos bancos de patentes EPO (*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*, *composite*, *doped*, *gallium*, *cerium*, *scaffold*, *polysaccharide*, *antiseptice* e “*antibacterial activity*” estão apresentadas na Tabela 4. Utilizando as palavras-chave da pesquisa em inglês e português, foi possível encontrar os depósitos de patentes nos principais bancos de dados de patentes. Segundos os dados dispostos na Tabela 4, no banco INPI foram encontradas 118 patentes depositadas com a palavra *hidroxiapatita* e 82 quando se utilizou a palavra arcabouço (*scaffold*).

Essas palavras combinadas, ou seja, *hidroxiapatita* AND *scaffold*, deram o resultado, por exemplo, de uma patente depositada no INPI sob número 0905514-2. A patente PI 0905514-2 traz um processo para a obtenção do *scaffold* de um biomaterial hidrogel compósito (CNHAP) à base de quitosana (QT) e HA, com grande potencial de aplicação na área médica-odontológica, demonstrando características de biocompatibilidade evidenciadas por ensaios clássicos in vitro. Estas características estão associadas à combinação de propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais que o compõem. CNHAP foi obtido na forma de hidrogel com boas

características mecânicas, de fácil manuseio e modelagem, com alta porosidade, o que o torna promissor como material de preenchimento ósseo.

Tabela 4. Quantidade de patentes encontradas nos bancos de patentes EPO, USPTO e INPI.

Palavras-chave	EPO	USPTO	INPI
<i>Hydroxyapatite</i>	8.573	636	118
<i>Composite</i>	>10.000	>10.000	2904
<i>Scaffold</i>	>10.000	2.360	82
<i>Polysaccharide</i>	>10.000	3.682	657
<i>Doped</i>	>10.000	26.823	82
<i>Gallium</i>	>10.000	5.190	121
<i>Cerium</i>	>10.000	3.005	275
<i>Antibacterial activity</i>	>10.000	1.117	117
<i>Antiseptic</i>	>10.000	595	61
<i>Hydroxyapatite and composite</i>	1.555	61	7
<i>Hydroxyapatite and scaffold</i>	293	15	4
<i>Hydroxyapatite and scaffold and polysaccharide</i>	2	895	0
<i>Hydroxyapatite and doped</i>	184	812	1
<i>Hydroxyapatite and doped and gallium</i>	0	87	1
<i>Hydroxyapatite and doped and cerium</i>	3	139	1
<i>Hydroxyapatite and doped and antibacterial activity</i>	3	180	1
<i>Hydroxyapatite and antiseptic</i>	25	601	0
<i>Hydroxyapatite and composite and antiseptic</i>	2	188	0
<i>Hydroxyapatite and doped and antiseptic and antibacterial activity</i>	0	19	0
<i>Hydroxyapatite and doped and antiseptic and composite and antibacterial activity</i>	0	7	0

Fonte: Adaptado de VIEIRA et al., 2018, p. 97.

A produção do *scaffold* hidrogel compósito CNHAP foi efetuada por um procedimento de mineralização *in situ* do hidrogel polimérico a base de QT, por HA. Este método de mineralização *in situ* promoveu características mecânicas e de bioatividade ao CNHAP, adequadas à aplicação médico-odontológico. Vale destacar que os termos combinados: hidroxiapatita e dopagem, hidroxiapatita e dopagem e gálio, hidroxiapatita e dopagem cério, no banco de patentes do INPI, registrou o total de uma patente. A patente BR 10 2018 009777-6 intitulada “Composição de hidroxiapatita dopada com metais com propriedades antimicrobianas para aplicações como materiais de preenchimento ósseo” é de propriedade dos autores desse estudo.

Além da biocompatibilidade, materiais de preenchimento de tecidos devem ser capazes de promover adesão, proliferação e diferenciação celular, requisitos essenciais à bioengenharia de tecidos, a qual vem sendo cada vez mais explorada,

dentro da prática clínica. Para os termos *hydroxyapatite and composite and antiseptic* revelaram um total de duas patentes no banco EPO. A patente CN204728143 (U), por exemplo, se trata do desenvolvimento de um biocompósito baseado em um antisséptico inorgânico e hidroxiapatita dopada com Ag e Zn sobre a superfície de fibras de celulose de bambu. Já para as combinações das expressões com as palavras-chave: *hydroxyapatite AND doped AND antiseptic AND composite AND “antibacterial activity”* não foram encontradas patentes depositadas nos bancos EPO e INPI e um total de 7 patentes no banco USPTO.

Avaliando os resultados encontrados, pode-se entender que os resultados expressam a inexistência de depósito de patentes e sugerem que essa área de pesquisa é bastante promissora. Nas pesquisas de patentes no banco de dados EPO (Tabela 4), ao se pesquisar patentes utilizando a expressão: *hydroxyapatite AND doped AND “antibacterial activity”*, 2 registros de patentes foram encontrados. Ao se utilizar a expressão: *hydroxyapatite AND scaffold AND polysaccharide*, também no EPO, foram encontrados 2 registros de patentes. Por fim, ao se utilizar a expressão: *hydroxyapatite AND composite AND antiseptic AND “antibacterial activity”* nenhum registro de patentes foi localizado. Na Tabela 5 se encontra as informações acerca dessas patentes encontradas.

Vale ressaltar que os polissacarídeos citados nas patentes (Tabela 5) foram definidos como sendo qualquer molécula composta por duas ou mais moléculas de unidades de monossacarídeos. Dentre eles, as patentes citaram a utilização da quitosana, do ácido hialurônico, do sulfato de condroitina, do alginato, da quitina, do dextrano e de outros polissacáridos naturais, que são o material de matriz extracelular ideal para a composição de *scaffolds* aplicados nas áreas da engenharia de tecidos e biomédica.

Os dados obtidos velaram que existe uma baixa quantidade de patentes relacionadas aos temas referentes a engenharia tecidual, ou seja, invenções associadas a HA e formuladas como biocompósitos, que é o tema geral desse trabalho. Em especial, existe um déficit de biomateriais com propriedades de atividade antibacteriana associadas a HA, a polissacarídeos e a composição de fármacos antimicrobianos e *scaffold* para aplicações de regeneração tecidual óssea. Foi abordado ao longo deste trabalho alguns dos problemas que as aplicações de

implantes podem causar ao organismo receptor, no caso, problemas infecciosos provenientes de bactérias.

Para uma melhor coerência aos resultados obtidos, foram avaliados produtos presentes no mercado a base de HA. A pesquisa por empresas especializadas no desenvolvimento e comercialização de biomateriais a base de hidroxiapatita com aplicações em engenharia de tecido foram realizadas através de buscadores de internet. As palavras-chave escolhidas mostraram informações sobre empresas, produtos e formulações.

Tabela 5. Características das patentes encontradas no EPO.

Título	Classificação	País	Resumo
Polyether ether ketone/nano hydroxyapatite dental implant and manufacturing method thereof.	A61L27/42; A61L27/12; A61L27/18; A61L27/54	China	Preparação de um implante dentário a base poliéter cetona/nanoHAp dopado com Ag ⁺ e Zn ²⁺ com propriedades antibacterianas.
Method for preparing antibacterial diamond-like carbon/hydroxyapatite gradient multi-element nano coating.	A61L27/30; A61L27/32; A61L27/54; C23C14/06; C23C14/35	China	Método para a preparação de um compósito base de carbono/HAP com propriedades antibacterianas para serem utilizados como materiais de revestimentos nas áreas biomédicas.
Porous polysaccharide scaffold comprising nano-hydroxyapatite and use for bone formation.	A61L27/12; A61L27/20; A61L27/56	França	Método para a preparação de um <i>scaffolds</i> compostos de polissacarídeo e hidroxiapatita utilizado como suporte de mineralização tecidual
Continuous gradient composite scaffold and preparation method thereof.	A61L27/26; A61L27/46	China	<i>Scaffold</i> composto por nanopartículas magnéticas de hidroxiapatita/ferro com elevada biocompatibilidade celular e alta resistência mecânica após a adição do polissacárido natural.

Fonte: Disponível em VIEIRA et al., 2018, p. 97.

Por exemplo, a empresa brasileira JHS Biomateriais desenvolve um compósito chamado de HAP-91 constituído de hidroxiapatita porosa, cristalina, biocompatível, pura, amplamente testado como material de enxerto ósseo e com excelente biocompatibilidade com organismos vivos. Além disso, é hidrofílica e o pó pode ser utilizado diretamente no organismo e pode ser também agregada a gotas do sangue do próprio paciente.

Outro biomaterial desenvolvido pela JHS Biomateriais é o COL.HAP-91. O COL.HAP-91 é um compósito de HA e colágeno que constituem um material

esponjoso (25% de colágeno e 75% de HAP-91) com propriedades hemostáticas da malha de fibras de colágeno natural purificado, biocompatível, biocompatível, fácil manuseio, absorvível e osteocondutor. Ambos os produtos são registrados junto ao Ministério da Saúde brasileiro e possuem também marca protegida junto ao INPI. O preço médio no mercado da HAP-91 gira em torno de R\$ 82,00 a 95,00 a cada 1000 g. Já o preço da unidade para material COL.HAP-91 varia entre R\$ 85,00 a 90,00.

A empresa brasileira Bionnovation®, em seu catálogo de produtos, vende enxerto ósseo de hidroxiapatita para aplicações em cirurgias ortopédicas, craniomaxilofacial e dentária. A hidroxiapatita é obtida a partir do hidróxido de cálcio e ácido fosfórico. O produto possui partículas radiopacas de diversos tamanhos que auxiliam no desenvolvimento das células ósseas.

Esses materiais, quando em contato com a matriz óssea, comportam-se como *scaffold* facilitando a migração de capilares e células do leito receptor para se diferenciar dentro desta estrutura calcificada e favorece a osteocondução de células formadoras de novo tecido ósseo. A empresa norte-americana *Berkeley Advanced Biomaterials Inc* desenvolve hidroxiapatita, fosfato tricálcico e outros produtos à base de cálcio. As suas atividades se concentram também aplicações como enxerto ósseo e cirurgias ortopédicas. A empresa europeia Fluidinova é especializada na produção de hidroxiapatita nanocristalina, comercializada sob a marca nanoMIX®. A Fluidinova abastece empresas que fabricam dispositivos médicos, cosméticos, cremes dentais e outras aplicações. Não foram encontrados materiais no mercado ao se pesquisar com as palavras-chaves: hidroxiapatita, engenharia de tecidos, polissacarídeos e scaffold, mesmo com as duas patentes depositadas na EPO (Tabela 5).

Porém, ao se utilizar as palavras-chave hidroxiapatita and engenharia de tecidos, empresas e produtos da área da engenharia tecidual foram encontrados como, por exemplo, a empresa *Atex Technologies Inc* (China), *Electrospinning Company* (Inglaterra), *Bio-Scaffold International Pte Ltd* (Singapura), *GeSiM* (Alemanha), *Matricel* (Alemanha), *Silkbiomaterial* (Italia), *ExCel Matrix Biological Devices (P) Ltd* (EUA) e *Nanofiber solutions* (EUA). A Tabela 6 mostra alguns materiais disponíveis no mercado a base de hidroxiapatita utilizados na área da engenharia tecidual. Está disponível também algumas empresas, sede, características, aplicação e nome comercial de alguns produtos existentes no mercado.

Tabela 6. Biomateriais a base de hidroxiapatita encontrando no mercado.

Empresa	Material	Característica	Aplicação	País sede
JHS Biomateriais	HAP-91	Pó	Enxerto ósseo	Brasil
JHS Biomateriais	COL.HAP-91	Scaffold	Enxerto ósseo	Brasil
Bionnovation®	HAP - Bionnovation®	Pó	Enxerto ósseo	Brasil
Baumer	GenPhos HA TCP	Pó	Enxerto ósseo	Brasil
Oral science	Remix®	Pasta	Dental Products	França
SofSera	SHAp	Pó	Enxerto ósseo	Japão
SANGI CO. LTD.	Medical nano- hydroxyapatite	Pasta	Dental Products	Japão
Sewon Cellontech Co., Ltd.	OssFill	Gel	Enxerto ósseo	Coréia do Sul
GranuLab	GranuMas®	Grânulos	Enxerto ósseo	Malásia
Fluidinova	nanoMIX®	Pó	Biomédica/Cosmético	Portugal
Berkeley Advanced Biomaterials Inc.	BABI-HAP-G2	Grânulos	Enxerto ósseo/ Cirurgias ortopédicas	EUA
Berkeley Advanced Biomaterials Inc.	BABI-HAP-N100	Pó	Compósitos/ Purificação de DNA e proteínas/ Material de referência.	EUA

Fonte: Disponível em VIEIRA, et al., 2018, p. 98.

4. CONCLUSÃO

Analisando os resultados apresentados pode-se afirmar a utilização da hidroxiapatita está relacionada a utilização nas áreas da engenharia tecidual e regeneração óssea. A produção de *scaffolds* está quase sempre associada aos polissacarídeos ou aos biopolímeros naturais devido as suas elevadas biocompatibilidades. A dopagem da hidroxiapatita com metais e a incorporação de antissépticos corresponde a uma área não explorada é bastante promissora, devido à ausência de publicações e as aplicações que esses materiais apresentam. As buscas relacionadas às patentes e artigos científicos, nos bancos levantados, mostram que há um número baixo de estudos que contenham as palavras-chave escolhidas e combinadas: *hydroxyapatite* and *scaffold* and *polysaccharide* and *doped* and *gallium* and *cerium* and *antiseptic* and *antibacterial activity*, referente ao objetivo deste trabalho. Entre os microrganismos, destacaram-se as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* como principais bactérias estudadas. Isto pode ser devido ao fato de serem as bactérias mais acessíveis para a realização de pesquisas, ademais, a *Staphylococcus aureus* é considerada um dos agentes mais comum presentes em infecções ósseas.

5. REFERÊNCIAS

- AINA, V. et al. 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**, v. 23, p. 2867–2879, 2012.
- AN, S. et al. Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction. **Dental Materials**, v. 28, n. 12, p. 1221–1231, 2012.
- AO, C. et al. Fabrication and characterization of electrospun cellulose/nano-hydroxyapatite nanofibers for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 568–573, 2017.
- BAPTISTA, I. et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by high pressure processing: An overview. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 128–149, 2016.
- BELLIS, C. A. et al. Glass ionomer cements functionalised with a concentrated paste of chlorhexidine hexametaphosphate provides dose-dependent chlorhexidine release over at least 14 months. **Journal of Dentistry**, v. 45, p. 53–58, 2016.
- BEST, S. M. et al. Bioceramics: past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 28, p. 1319–1327, 2008.
- CIOBANU, G.; BARGAN, A.M.; LUCA, C. New cerium (IV)-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Preparation and characterization. **Ceramics International**, v. 41, p. 12192–12201, 2015.
- DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. **Materials**, v. 2, p. 399–498, 2009.
- DOROZHKIN, S.V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31, p. 1465–1485, 2010.
- DUTT, P.; RATHORE, P. K.; KHURANA, D. Chlorhexidine - An antiseptic in periodontics. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 13, n. 9, p. 85–88, 2014.
- FERRARIS, S. et al. Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration. **Applied Surface Science**, v. 311, p. 279–291, 2014.
- FARZADI, A. et al. Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. **Ceramics International**, v. 40, n. 4, p. 6021–6029, 2014.
- FOOK, A.C.B.M.; et al. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea. **Revista Matéria**, v. 3, n. 15, p. 392–399, 2010.

GAYATHI, B. et al. Magnesium incorporated hydroxyapatite nanoparticles: Preparation, characterization, antibacterial and larvicidal activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 645–654, 2018.

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, 172–180, 2014.

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.

HADAVI, M. et al. Novel calcified gum Arabic porous nano-composite scaffold for bone tissue regeneration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 488, n. 4, p. 671–678, 2017.

HSIEH, P.H. et al. Gram-Negative Prosthetic joint infections: risk factors and Outcome of treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1036–1043, 2009.

HU, C.; YU, L.; WEI, M. Sectioning studies of biomimetic collagen-hydroxyapatite coatings on Ti-6Al-4V substrates using focused ion beam. **Applied Surface Science**, v. 444, p. 590–597, 2018.

IZAWA, H. et al. Mineralization of hydroxyapatite upon a unique xanthan gum hydrogel by an alternate soaking process. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 846–851, 2014.

KALAMBETTU, A.; DHARMALINGAM, S. Fabrication and in vitro evaluation of Sulphonated Polyether Ether Ketone/nano Hydroxyapatite composites as bone graft materials. **Material Chemistry and Physics**, v. 147, p. 168–177, 2014.

KANNAN, S. et al. Ionic substitutions in biphasic hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate mixtures: structural analysis by Rietveld refinement. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 91, p. 1–12, 2008.

KAWABATA, K.; YAMAMOTO, T.; KITADA, A. Substitution mechanism of Zn ions in β -tricalcium phosphate. **Physica B: Condensed Matter**, v. 406, p. 890–894, 2011.

KAWACHI, Y.E. et al. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. **Química Nova**, v. 4, n. 3, p. 518–522, 2000.

KIKUCHI, M. et al. Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. **Compos Sci Technol**, v. 64, p. 819–825, 2004.

KOLMAS, J., GROSZYK, E.; KWIATKOWSKA-RÓŻYCKA, D. Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties. **BioMed Research International**, v. 2014, 1–15, 2014.

KOZLOVSKY, A. et al. Interaction of chlorhexidine with smooth and rough types of titanium surfaces. **Journal Periodontol**, v. 77, n. 7, p. 1194–1200, 2016.

KURTJAK, M. et al. Biocompatible nano-gallium/hydroxyapatite nanocomposite with antimicrobial activity. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 11, 2016.

LIN, K.; WU, C.; CHANG, J. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 4071–4102, 2014.

MELNIKOV, P. et al. Gallium-containing hydroxyapatite for potential use in orthopedics. **Materials Chemistry and Physics**, v. 117, n. 1, p. 86–90, 2009.

MELNIKOV, P. et al. Evaluation of in vitro toxicity of hydroxyapatite doped with gallium. **Materials Letters**, v. 253, p. 343–345, 2019.

MORAIS, D.S. et al. Samarium doped glass-reinforced hydroxyapatite with enhanced osteoblastic performance and antibacterial properties for bone tissue regeneration. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, p. 5872–5881, 2014.

MORAIS, D.S. et al. Novel cerium doped glass-reinforced hydroxyapatite with antibacterial and osteoconductive properties for bone tissue regeneration. **Biomedical materials**, v. 10, n. 4, p. 1–15, 2015.

MISHRA, V.K. et al. Mg-doped hydroxyapatite nanoplates for biomedical applications: A surfactant assisted microwave synthesis and spectroscopic investigations. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 614, 283–288, 2014.

NAGANO, S. et al. Analysis of surgical site infection after musculoskeletal tumor surgery: risk assessment using a new scoring system. **Sarcoma**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

NAMBA, R. S., INACIO, M. C., PAXTON, E. W. Risk factors associated with deep surgical site infections after primary total knee arthroplasty: an analysis of 56,216 knees. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 95, p. 775–782, 2013.

OLIVEIRA, L. S. A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1. 37–44, 2010.

OYEFUSI, A. et al. Hydroxyapatite grafted carbon nanotubes and graphene nanosheets: Promising bone implant materials. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 410–416, 2014.

RADOVANOVIC, Z. et al. Antimicrobial activity and biocompatibility of Ag⁺- and Cu²⁺-doped biphasic hydroxyapatite/ α -tricalcium phosphate obtained from hydrothermally synthesized Ag⁺- and Cu²⁺-doped hydroxyapatite. **Applied Surface Science**, v. 307, p. 513-519, 2014.

ROANE, T. M. et al. Microorganismos. *In*: PEPPER, I. L., GERBA, C. P., GENTRY, T., MAIER, R. M. **Environmental Microbiology**. 2. ed. 2009. cap. 2, p. 9–36.

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.

SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 7591-7621, 2013.

SANTOS, M. V. B.; OSAJIMA, J. A.; SILVA FILHO, E. D. Hidroxiapatita: suporte para liberação de fármacos e propriedades antimicrobianas. **Cerâmica**, v. 62, n. 363, p. 256-265, 2016.

SANYAL, V.; RAJA, C. R. Structural and antibacterial activity of hydroxyapatite and fluorohydroxyapatite co-substituted with zirconium-cerium ions. **Applied Physics A**, v. 122, p. 1–12, 2016.

SHEPHERD, J. H., SHEPHERD, D. V, BEST, S. M. Substituted hydroxyapatites for bone repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, p. 2335–2340, 2012.

SILHAVY, T.J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives em Biologia**, v. 2, n. 5, p. 1–17, 2010.

SOUZA, C. A. S. DE et al. Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 310–318, 2011.

STEFANI, S. et al. Insights and clinical perspectives of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: A review of the available evidence. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 3, p. 278–289, 2015.

SUPOVÁ, M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. **Ceramics international**, v. 41, p. 9203–9231, 2015.

SWETHA, M. et al. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 1–4, 2010.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, p. S311–324, 2009.

YANG, M.; REN, J.; ZHANG, R. Novel gallium-doped amorphous calcium phosphate nanoparticles: Preparation, application and structure study. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 466–467, n. 2016, p. 15–20, 2017.

CAPÍTULO 2: ESTUDO EXPERIMENTAL E TEÓRICO

Biomaterial de hidroxiapatita dopada com gálio e clorexidina com propriedades antibacterianas: um estudo experimental e teórico

Resumo

Biomateriais têm sido cada vez mais utilizados como materiais de restauração e de preenchimento de tecidos ósseos e dentários. A hidroxiapatita dopada com Ga (Ga-HA) associada a clorexidina (CLX), pode ser uma dessas alternativas. Nesse trabalho, a síntese da Ga-HA ocorreu via método da precipitação química, seguida da formulação do biomaterial Ga-HA/CLX que ocorreu na interface sólido-líquido variando a concentração da CLX (0,20; 0,80 e 1,20% v/v). Os resultados de caracterização das partículas de Ga-HA por DRX revelaram uma similaridade com o padrão JCPDS 001-1008. O refinamento de Rietveld confirmou a existência de um perfil cristalino semelhante ao cartão de número 26205 (ICSD), com estrutura hexagonal e grupo espacial P63/m. A caracterização por XPS confirmou a presença do Ga e a razão Ca/P variou entre 1,50 a 1,72. Os espectros de FTIR dos biocompósitos Ga-HA/CLX mostraram uma banda em 830 cm^{-1} , correspondente à deformação dos grupos fosfatos e deformações de grupos CH_2 próximas a região de 1530 cm^{-1} que são referentes a CLX. Os materiais tiveram as suas propriedades antibacterianas (método do contato direto) e de citotoxicidade (ensaio do MTT) avaliadas. Os materiais Ga-HA/CLX, em concentrações variando entre 0,20 a 1,20% v/v, apresentaram 100% de eficiência inibitória contra as cepas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O ensaio de MTT revelou que a presença do Ga no material potencializou os efeitos de viabilidade celular (fibroblastos). As cerâmicas HA e Ga-HA tiveram um nível de confluência celular de $89,4 \pm 1,0\%$ e $99,1 \pm 3,2\%$, respectivamente e a proliferação celular para o compósito Ga-HA/CLX-0,20 foi $81,0 \pm 3\%$. Assim, esses materiais foram classificados como sendo não-tóxicos. Finalmente, após síntese e avaliação dessas propriedades biológicas, através de cálculos DFT (*Density Functional Theory*), foi possível verificar a termodinâmica favorável entre a interação HA-CLX mediante coordenação do átomo de N do grupo C=NH da CLX com átomos de cálcio da superfície da HA.

Palavras-chave: hidroxiapatita, gálio, antisséptico, biocompósitos dentários, atividade antibacteriana, biocompatibilidade.

1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais são definidos como uma classe de compostos que induzem uma resposta apropriada ao interagir com moléculas biologicamente ativas e os organismos vivos (CHEN; LIU, 2016). Dentre esses biomateriais, os biocompósitos dentários têm sido estudados e utilizados há mais de 60 anos como materiais de restauração e de preenchimento de tecidos ósseos e dentários (ALJABO et al., 2016).

Esses biomateriais e suas formulações como biocompósitos devem apresentar e possuir um conjunto de propriedades mecânicas e biológicas adequadas que permitam exercer funções que irão auxiliar, substituir e estimular o crescimento desses tecidos duros (GOMES et al., 2019; SIDDIQUI; PICKERING; MUCALO, 2018; WAHL; CZERNUSZKA, 2006). Nesse contexto, a hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é uma biocerâmica muito usada em processos de reparação tecidual ósseo por ser a principal constituinte da parte inorgânica do osso, além disso, apresenta elevadíssimas propriedades de osteoindução, osteocondução e osteogênica⁴ (DACULSI et al., 2013; KATTIMANI; KONDAKA; LINGAMANENI, 2016; WANG et al., 2019).

Esse tipo de biomaterial pode passar por modificações pontuais em suas propriedades físico-químicas e biológicas, tais quais, a potencialização nos seus efeitos antibacterianos, proliferação e diferenciação celular, efeitos não citotóxicos e interação com fármacos como, por exemplo, modificações que podem ser realizadas por meio da incrementação de substituintes dopantes: Ag^+ (LAMKHAO et al., 2019), Cu^{2+} e Zn^{2+} (MARIAPPAN et al., 2017), SeO_3^{2-} (KOROWASH et al., 2017), Sr^{2+} (TSAI et al., 2018) e metais representativos ($\text{M}^{3+} = \text{Al}^{3+}, \text{Ga}^{3+}, \text{In}^{3+}$ e Bi^{3+}) (KOLEKAR et al., 2016; MELNIKOV et al., 2009; TITE et al., 2018; WEBSTER et al., 2004).

O gálio (Ga^{3+}), um cátion bioativo, por exemplo, pode estar presente em biomateriais inorgânicos para aplicações ortopédicas pois pode aumentar os efeitos físicos, químicos e biológicas nos tecidos adjacentes (GELJIC et al., 2018). O Ga é atualmente considerado não-tóxico em organismos vivo e, mesmo que os sais e complexos de gálio não tenham função fisiológica conhecida no corpo humano, algumas de suas características permitem a sua interação com processos celulares e

⁴ É o relativo à osteogenia, que é a formação normal do tecido ósseo por meio das células osteoblastos e osteoclastos.

proteínas biologicamente importantes, especialmente as que atuam no metabolismo do ferro (MELNIKOV et al., 2019).

Embora os detalhes da ação do Ga no osso humano ainda sejam incertas, já está bem estabelecido que o mecanismo que envolve a inserção do Ga na rede cristalina da HA causa uma maior proteção relativas a reabsorção dessa biocerâmica e causa um melhoramento nas suas propriedades biomecânicas quando aplicadas em sistema esquelético vivos (MELNIKOV; MALZAC; COELHO, 2008).

Vale ressaltar também que a inserção de íons dopantes dentro dos parâmetros de rede da HA podem acarretar também efeitos pontuais de mudanças na sua cristalinidade (SAFARZADEH et al., 2019), aumento o nível de interação entre a HA e a biomineralização tecidual (HUANG et al., 2015), uma vez que a estrutura óssea não é composta somente por uma fase mineral inorgânica, mas também por uma matriz orgânica, constituída principalmente por colágeno e polipeptídios (CURREY, 2005; WEINER; WAGNER, 1998).

Em busca de um biomaterial que possua uma eficiência inibitória bacteriana, a associação superficial de antissépticos para formulações de biocompósitos cerâmicos se mostra ser uma excelente alternativa. A funcionalização superficial da HA, por exemplo, pode acarretar na potencialização das características biológicas e antibacterianas nesses biomateriais (SANTOS et al., 2019).

Assim, a clorexidina⁵ (CLX), $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ (1, 1-bis hexametileno (5-p-clorofenilbiguanida) di-D-gluconato), por exemplo, um antisséptico biocida com propriedades antimicrobianas (DUTT; RATHORE; KHURANA, 2014), que apresenta uma efetividade no controle de bactérias patogênicas na cavidade bucal ou como agente tópico (PANPALIYA et al., 2019), geralmente em produtos de higiene oral, produtos para tratamento de doença periodontal e vernize por ser uma alternativa para constituir esses tipos de formulações (PRETTI et al., 2015), pois agrupamentos menores de sais de CLX são o suficiente para retardar o desenvolvimento ou eliminar as placas bacterianas, uma vez que quando administrados de maneira correta e em concentrações adequadas, a CLX exibe baixos efeitos tóxicos e corrosivos (KLUK; REINHOLD; PEREIRA, 2016).

⁵ A clorexidina é uma base fraca, possui valor de constante de dissociação (pKa) a 25 °C de 10,8 e seu coeficiente de partição octanol/água (log P) é 0,1.

Por isso, alguns estudos sugerem a utilização da CLX como agente antibacteriano em implantes ósseos devido à alta resposta contra uma ampla variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas (BELLIS et al., 2016). Porém, o grande desafio terapêutico é da obtenção de um sistema antimicrobiano eficaz que mantenha os efeitos inibitórios por um determinado período adequado, reduzindo a incidência da infecção local e de efeitos adversos, além de estimular o crescimento tecidual ósseo e a rápida recuperação do paciente em recuperação.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo sintetizar e caracterizar a hidroxiapatita dopada com gálio (Ga-HA), seguida da produção e caracterização de um biocompósito do tipo Ga-HA/clorexidina (CLX), da avaliação das suas propriedades antibacterianas contra as cepas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e seus efeitos de citotóxicas (*in vitro*) exercidas por diferentes concentrações de CLX adsorvida na superfície da Ga-HA; por fim, demonstrar através de cálculos DFT (*Density Functional Theory*) alguns parâmetros termodinâmicos das possíveis interações superficiais existentes entre a Ga-HA e a CLX.

2. METODOLOGIA

2.1 Materiais e reagentes

Foram utilizados os reagentes: hidróxido de cálcio (Vetec), Ca(OH)_2 ; fosfato de amônio dibásico (Neon), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, nitrato de gálio ($\text{Ga(NO}_3)_3$) (Sigma-Aldrich) e clorexidina, $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10}$, a 20% v/v (Polyorganic). Os reagentes não passaram por processo de purificação prévia e a água utilizada para os processos de síntese foi obtida pela purificação em um sistema Milli-Q (Millipore Corporation). Para os experimentos de viabilidade celular utilizou-se a linhagem celular GM07492 (fibroblasto humano), células/poço: 1×10^5 , meio de cultura DMEM (Gibco/Thermofisher), suplementado com soro bovino fetal (SBF) (nutricell), DMSO (Sigma-Aldric), penicilina e estreptomicina 10U/mL (Sigma-Aldrich).

2.2 Síntese do compósito hidroxiapatita/clorexidina

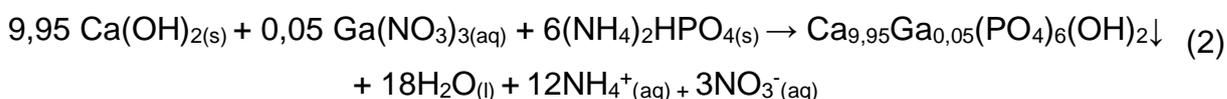
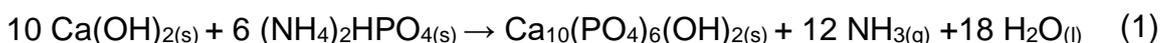
2.2.1 Estágio I

O primeiro estágio (E_1) desse estudo foi sintetizar partículas de hidroxiapatita pura (HA) e dopada com gálio (Ga-HA). A síntese ocorreu por meio do método da precipitação química (MPQ) (PANDEY et al., 2018) (Equação 1). Inicialmente, para a síntese da HA (Síntese I = S_1), 0,3700 g de Ca(OH)_2 e 0,4473 g de $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ foram

dissolvidos em 50,0 mL de água deionizada. Então, cada solução contendo os percussores foi adicionada em um béquer de 250,0 mL para que a síntese via MSPQ fosse iniciada. A sistema ficou sob agitação magnética por 3 h a 50 °C até a formação de um precipitado branco. Esse precipitado então foi filtrado, centrifugado (2500 rpm/5 min) e lavado com água destilada (5x) e seco em estufa (100 °C por 12 h). O pó branco obtido foi desaglomerado com almofariz e pistilo e passado em uma peneira de malha 35 VT com abertura de 425 µm.

2.2.2 Estágio II

A síntese das partículas Ga-HA foi processada conformes a Si; porém, com a adição do agente dopante ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) na sua forma em solução, com quantidade de 5,00% m/m em relação ao íon substituinte (Ca^{2+}) seguindo a relação estequiométrica entre Ca/P (Equação 2) escolhida para esse estudo ($\text{Ca}_{9,95}\text{Ga}_{0,05}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (SINGH et al., 2017). As sínteses ocorreram em sistema aberto, em meio básico (pH = 10), sem a utilização de calcinação após filtragem e lavagem dos pós obtidos.



O segundo estágio (E_{II}) foi realizar a incorporação da clorexidina (CLX) na superfície do material. A funcionalização das hidroxiapatitas (HA e Ga-HA) ocorreu usando aproximadamente 0,50 g dos pós sintetizados no E_I desse estudo com 25,0 mL de uma solução de CLX. A concentração de CLX escolhida para esse estudo foi baseada em trabalhos já realizados anteriormente pelo grupo (SANTOS et al., 2019) que utilizaram a CLX em um intervalo de concentração entre 0,20% a 20% v/v, assim, escolheu-se o intervalo de concentração de 0,20 a 1,20% v/v. Dessa forma, a incorporação da CLX ocorreu via processo da interface sólido-líquido por agitação rotacional (150 rpm), com temperatura fixa de 40 °C, em um período de tempo de 8h. A solução do sobrenadante foi separada por centrifugação e quantificada, em triplicata, através do UV-Vis ($\lambda = 255 \text{ nm}$) para a determinação da concentração final das soluções através da Equação 3:

$$Q_e = \frac{(C_i - C_f)}{m} x V \quad (3)$$

no qual, Q_e é a quantidade de CLX incorporada na hidroxiapatita em mg/g, C_i a concentração inicial da solução de CLX em mg/L, C_f a concentração do sobrenadante em mg/L, V é o volume que foi utilizado no teste de adsorção (mL) e m é a massa de HA que foi utilizada no teste de adsorção (g).

2.3 Caracterização

2.3.1 Caracterização da hidroxiapatita

Os pós sintetizados foram caracterizados pela técnica de difração de raios-X (DRX). Foi utilizado o equipamento LABX – XDR 600, Shimadzu, Cu – $K\alpha$ ($\lambda = 1,5406\text{\AA}$) com 2θ no intervalo de 10° a 60° , com taxa de varredura de $2^\circ/\text{min}$ e tempo de exposição de 40 min. A identificação da composição das fases foi realizada pelo refinamento 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 $1^\circ/\text{min}$, 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).

A identificação do gálio foi realizada por meio da Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS). Os espectros foram obtidos com um sistema de espectrômetro (ESCA+, Scienta-Omicron) equipado com um analisador hemisférico (EA125) e uma fonte de radiação monocromada Al $K\alpha$ (Xm1000, 1486,7 eV). A fonte de raios-X foi usada com uma potência de 280 W, enquanto o espectrômetro trabalhava em um modo de passos de energia constante de 50 eV. As análises foram realizadas no Grupo Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos – Instituto de Física de São Carlos – USP.

2.3.2 Caracterização do composto hidroxiapatita/clorexidina

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi realizada em um espectrômetro modelo Vertex 70 (Brucker 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 foram maceradas em um almofariz de ágata e a quantidades de pós de aproximadamente 1,0 mg foram misturados com 100 mg de KBr.

As análises termogravimétricas 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 em atmosfera de argônio com fluxo de 100 mL/min em porta amostra de alumina na faixa de temperatura de 25 a 1000 °C.

As micrografias das amostras foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura (FE-SEM) 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). As 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.

2.3 Atividade antibacteriana via método do contato direto

O teste de atividade antibacteriana foi realizado via método do contato direto (MCD) utilizando duas cepas de bactérias gram-negativa (*Escherichia coli* - ATCC 25,922) e gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - ATCC 25,923). A partir dos meios de cultura 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% (BHI), seguido de incubação a 37 °C por 24 h. A partir desta cultura em BHI preparou-se uma suspensão bacteriana padronizada para uma densidade equivalente a 0,5 na escala Mac Farland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias - UFC). E em seguida foram realizadas diluições decimais seriadas, em solução salina fisiológica, obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^4$ UFC/mL para ambos os microrganismos.

O teste antimicrobiano foi realizado por contato direto, tendo como resultado a contagem de unidade formadora de colônias (UFC). 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). Em seguida, 2000,0 µL desta suspensão diluída foram transferidas para um tubo tipo falcon esterilizado, ao qual foi adicionado 2000,0 µg do biomaterial. Para determinação do efeito inibitório, 100,0 µL

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 24 h a 37 °C, em seguida foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). O teste foi realizado em triplicata para cada uma das concentrações testadas. No Controle positivo os produtos foram substituídos por uma solução salina (2000 µL) para posterior comparação das soluções com os produtos testados. O efeito inibitório produzido por cada solução-teste foi calculado de acordo com a Equação 4:

$$\eta = \frac{N_1 - N_2}{N_1} \times 100\% \quad (4)$$

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.

2.4 Viabilidade celular

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* seguiu os procedimentos descritos na ISO 10993-5:2009. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). As células de fibroblastos humanas (GM07492) foram inicialmente semeadas (15×10^3 células/ poço) em placas de 96 poços, as quais, foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e enriquecidas com soro bovino fetal (FBS - 10% v/v) e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Foram encubadas em estufa (Panasonic MOC-19-AIC-UV CO₂) na temperatura de 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Os materiais foram pesados, esterilizados, imersos em meio de cultura (20 mg/mL) e mantidos a 37 °C durante 24 h para realizar os procedimentos de extração (TAVARES et al., 2011).

Após isso, o meio de cultura semeados foi substituído por 100 µL de meio resultante do procedimento de extração de cada amostra. Este experimento foi realizado em triplicata e mantido em condições padrão durante 24 h. Posteriormente, o meio de cultura foi removido dos poços, os quais foram lavados com tampão fosfato salino (PBS). Então, alíquotas de 50 µL de MTT foram adicionadas a cada poço e as células foram mantidas em condições de cultura durante 4 h. Após incubação, 100,0

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 percentagens de viabilidade celular em relação a um grupo de controle negativo (DMEM + 10% e FBS = 100% da viabilidade celular). Os efeitos de citotoxicidade foram expressos em termos de porcentagem usando a Equação 5, o grupo controle considerado foi considerado como sendo 100% de viabilidade celular (KIM et al., 2018).

$$DO(\%) = \left(\frac{\text{Absorção das células tratadas}}{\text{Absorção das células controle}} \right) * 100\% \quad (5)$$

Como controle positivo foram usados DMEM + 30% de DMSO e como controle negativo, foram usados DMEM + soro bovino fetal + antibióticos. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Química Medicinal e Medicina Regenerativa da Universidade de Araraquara – UNIARA. A Figura 1 traz um esquema mostrando a etapa da síntese da Ga-HA, a obtenção do compósito e os testes de avaliação biológica (antibacteriano e de viabilidade celular).

2.5 Análise Estatística

Os dados foram estatisticamente analisados usando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Os grupos foram comparados usando one-way ANOVA e teste post-hoc Fisher. O intervalo de confiança de 95% e nível de significância de $p \leq 0,05$ foram consideradas para todos os testes.

2.6 Detalhes Computacionais

Todos os cálculos foram realizados com o uso do *software* Gaussian 09, através da Teoria do Funcional de Densidade (DFT, *Density Functional Theory*) (BURKE, 2007; MORGON; CUSTÓDIO, 1995) utilizando o método B3LYP (BECKE, 1993; KOHN; SHAM, 1965; LEE; YANG; PARR, 1989) e conjunto de base CEP – 31G(d), conforme empregado na teoria G3(MP2)//B3-SBK (LEAL; CUSTODIO, 2019), para obtenção das geometrias e frequências vibracionais. Cálculos de energia eletrônica total e energia de Gibbs, a 0 e 298,15 K respectivamente, foram efetuados inicialmente com otimização em fase gasosa e em seguida levando em consideração

a influência do solvente com uso do Modelo Contínuo Polarizável (PCM, *Polarizable Continuum Model*) (TOMASI; MENNUCCI; CAMMI, 2005) em meio aquoso no intuito de uma melhor aproximação com a realidade experimental.

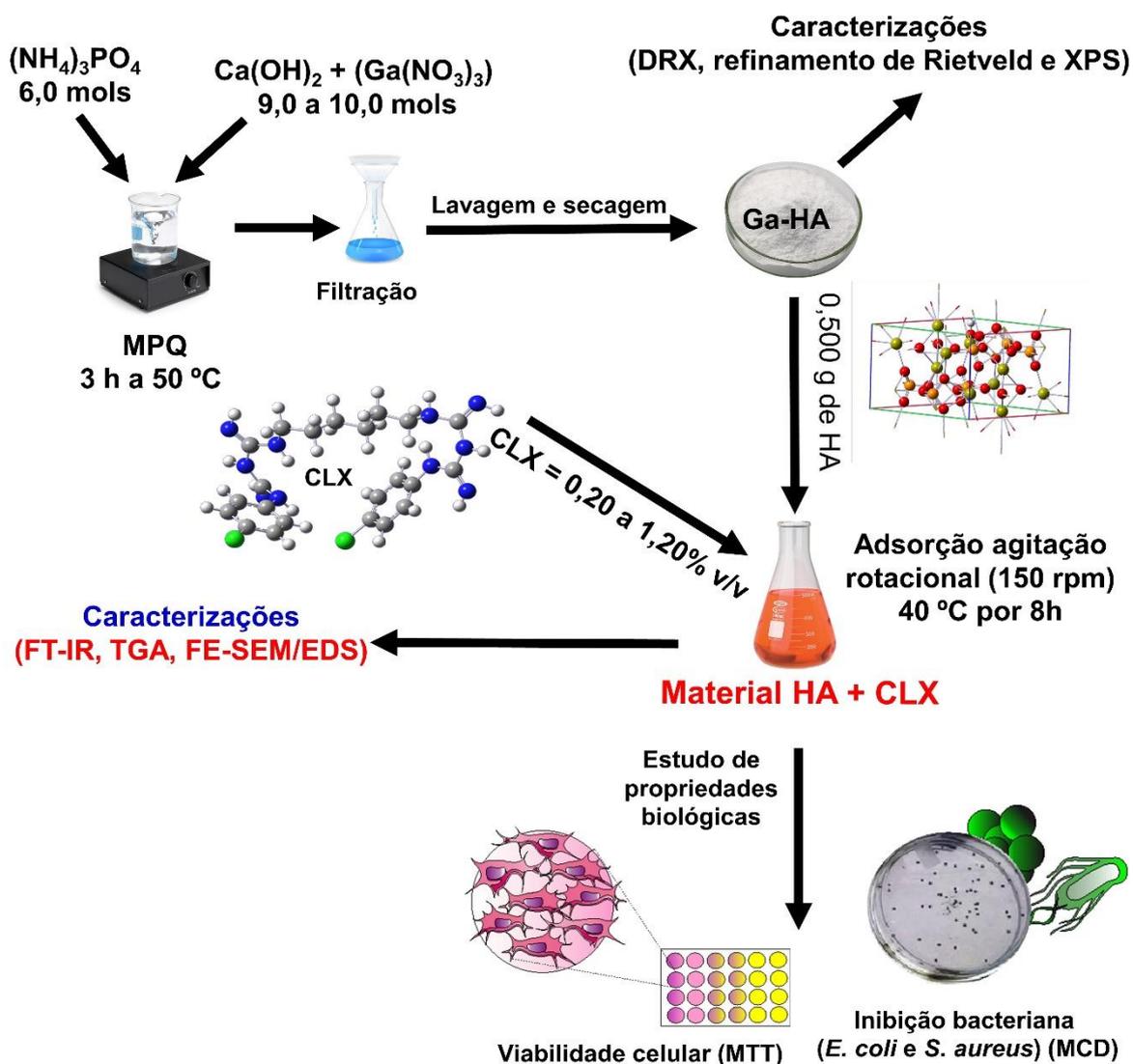


Figura 1. Esquema representativo das metodologias e procedimentos utilizados para a avaliação estrutural e biológica do compósito Ga-HA/CLX.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da HA, Ga-HA e do compósito.

Após a síntese da hidroxiapatita por meio da MPQ, para a confirmação efetiva da fase e avaliação da cristalinidade do material, o ensaio do DRX foi realizado na amostra de Ga-HA. Os difratogramas são mostrados na Figura 2a. Pelos difratogramas, os materiais sintetizados possuem boa cristalinidade e a presença de fases intermediárias não foram observadas. Os planos específicos que caracterizam a fase cristalina da hidroxiapatita: $\{1\ 1\ 1\}$, $\{0\ 0\ 2\}$, $\{1\ 0\ 2\}$, $\{2\ 1\ 0\}$, $\{2\ 1\ 1\}$, $\{2\ 0\ 2\}$, $\{3\ 1\ 0\}$, $\{3\ 1\ 2\}$, $\{2\ 1\ 3\}$ e $\{5\ 1\ 1\}$ foram detectados, sendo indexados junto a ficha catalográfica JCPDS 001-1008; deste modo, as suas detecções sugerem que o material foi obtido com êxito na sua forma cristalina (ARUL, 2018).

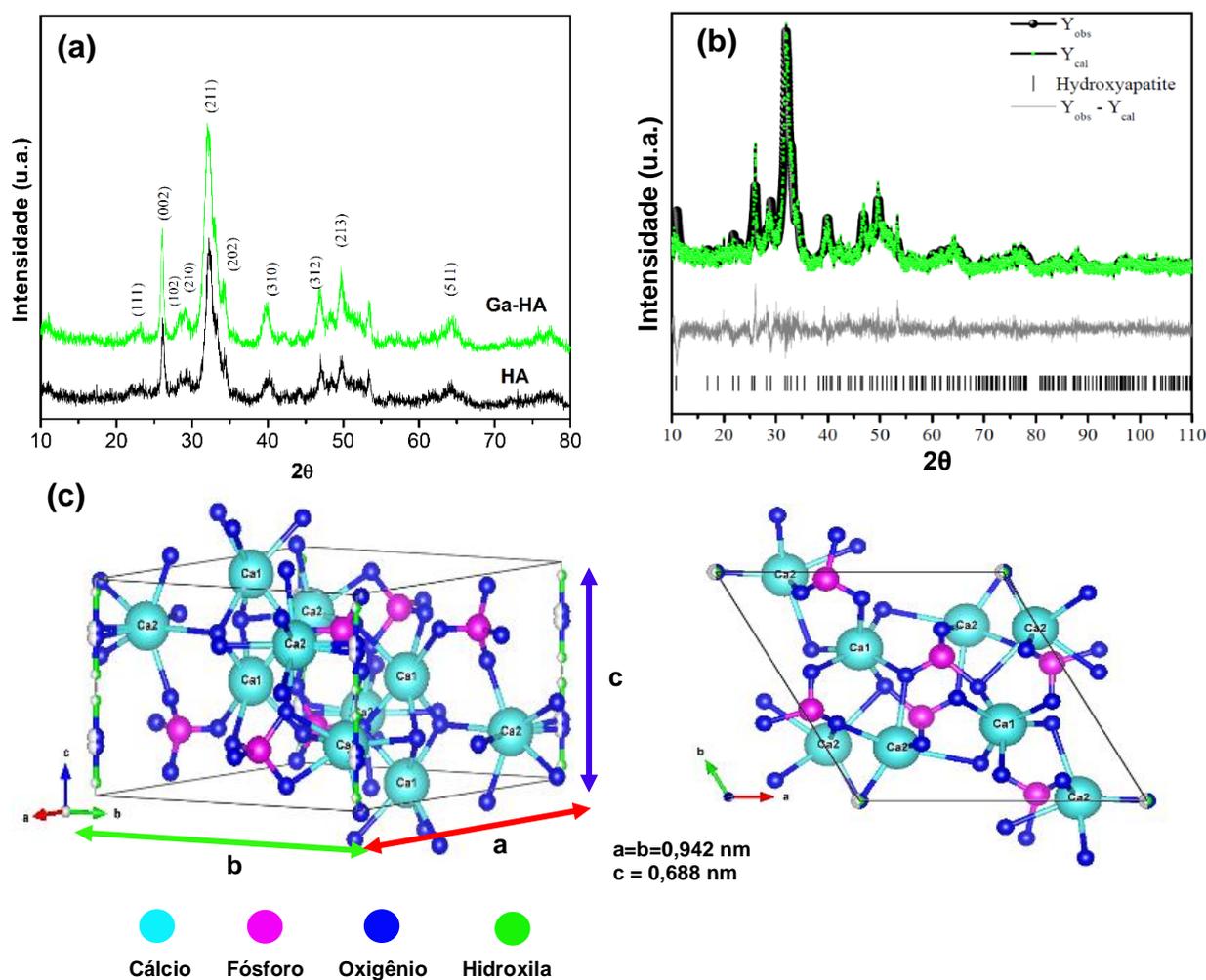


Figura 2. (a) Padrão de DRX para HA e Ce-HA, (b) refinamento de Rietveld para Ga-HA e (c) representação das células unitárias das hidroxiapatitas obtida nesse estudo.

O refinamento por meio do método de Rietveld foi realizado para se ter uma estimativa da aproximação dos difratogramas do modelo experimental em comparação com arquivos .CIF disponibilizado em bancos de dados de cristalografia. A Figura 2b mostra um bom acordo entre os padrões de DRX observados e os resultados de ajuste teórico calculados para a Ga-HA. O difratograma da Ga-HA possuiu uma 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. Esses valores foram bem próximos aos calculados por Ciobanu et al., 2015. Normalmente, um refinamento é qualificado como satisfatório quando o valor de Chi2 ou χ^2 (fator de convergência) é entre 1 e 2 ($\chi^2 = 1$ e 2) (VIEIRA et al., 2013). Para esse refinamento o valor de χ^2 foi igual a 1,966, indicando que o refinamento foi bem-sucedido.

Na Figura 2c tem-se a representação da célula unitária de estrutura da hidroxiapatita simulada pelo programa VESTA (*Visualization for Electronic and Structural Analysis*) (MOMMA; IZUMI, 2011), versão 3.4.5 para Windows, com base nos parâmetros de rede (a , b , c , α , β e γ) e posições atômicas (x , y e z) obtidos após o refinamento. A célula unitária é formada por 10 íons de Ca situados em dois sítios cristalográficos não equivalentes. São 4 localizados no sítio Ca1 e 6 que estão localizados no sítio Ca2. No sítio Ca2, os íons de cálcio que estão organizados na forma de triângulos perpendiculares ao eixo c . Existe 4 sítios cristalinos distintos contendo 16 oxigênio divididos em: O1, O2, O3 e O4. O O4 está ligado a OH, o grupo de fosfato é o maior íon que constrói célula unitária, sendo esse grupo quem determina a sua estrutura e os sítios de P são todos equivalentes. Por fim, o fosfato PO4 forma uma unidade compacta, sendo P ligado a um O1, um O2 e dois O3 (LALA et al., 2016).

A Figura 3 mostra os espectros de XPS para a amostra Ga-HA. Por meio da técnica de XPS foi possível detectar os principais picos característicos dos elementos químicos que constituem a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Figura 2a), são eles: 532 eV (O_{1s}), 438 eV (Ca_{2s}), 347 eV (Ca_{2p}), 189 eV (P_{2s}), 133 eV (P_{2p}) e 43 eV (Ca_{3s}). Na Figura 3b é possível observar as linhas de emissão relativas aos elétrons ejetados do Ga na região entre 18 a 32 eV. A energia de ligação (E.L.) identificada no XPS em

torno de 24 eV revelou que o pico se refere aos elétrons excitados do orbital 3d do Ga.

O conjunto mais intensivo de picos de XPS para o Ga_{3d} encontram-se na região de 18 eV (CARLI; BIANCHI, 1994). Essa E.L. pertencente ao estado eletrônico spin-orbital do tipo Ga_{3d5/2}-Ga_{3d3/2} que é característico para a espécie química gálio metálico; porém, esse pico em específico, não foi detectado na amostra Ga-HA. Zatsepin et al. 2018, afirmam que E.Ls. entre 20 a 25 eV podem ser atribuídas a formação do conjunto O_{2s}(II)+Ga_{3d}, que produz a ligação do tipo Ga-O (ZATSEPIN et al., 2018).

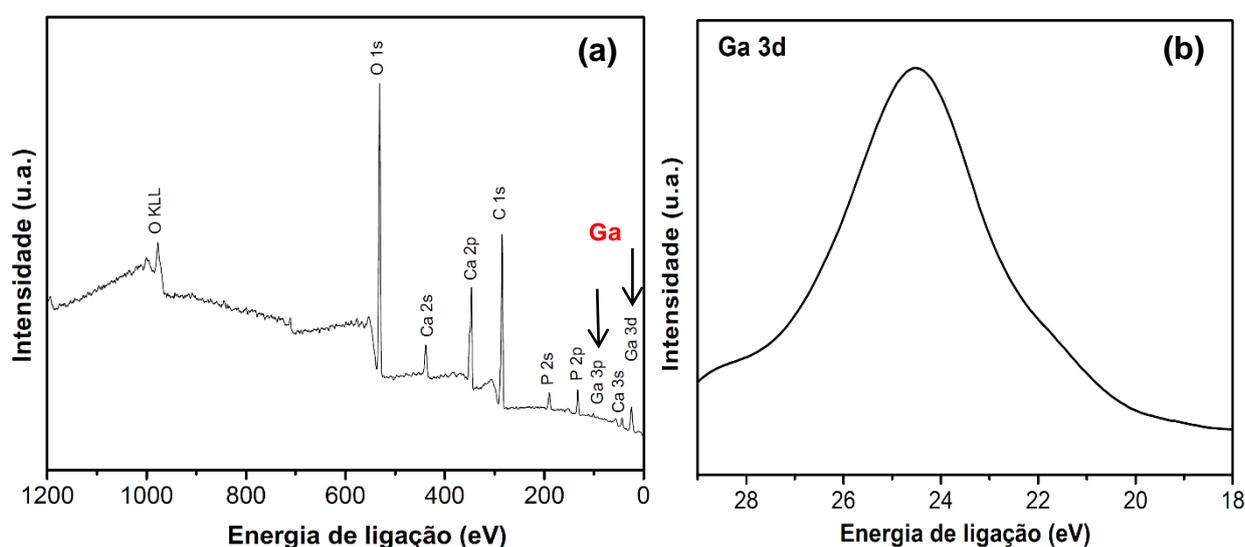


Figura 3. (a) Espectro de XPS para a Ga-HA e (b) linhas de emissão relativas aos elétrons ejetados dos orbitais 3d do Ga.

Vale ressaltar que a célula unitária da hidroxiapatita (Figura 2d) é formada por 10 íons de cálcio situados em dois sítios distintos (Ca1 e Ca2) que estão ligados aos oxigênios. Pelo valor da E.L. encontrada pelo XPS, acredita-se que o Ga possa estar substituindo o Ca nos parâmetros da sua célula unitária formando a ligação do tipo Ga-O. Portanto, mais uma vez esse resultado pode ser um forte indício da inserção do Ga na rede cristalina da hidroxiapatita.

A razão Ca/P desses materiais foi calculada também por meios de dados fornecidos pela técnica de XPS. Os resultados mostram que a razão Ca/P para a HA foi de 1,50 e para a Ga-HA foi de 1,30, respectivamente. Já a razão (Ca+Ga)/P, que leva em consideração a quantificação de dopante, foi de 1,72. A Figura 4 mostra o espectro com os respectivos valores de quantificação dos componentes elementares

da amostra Ga-HA. A Tabela 1 traz os valores dos componentes elementares que constituem as hidroxiapatitas sintetizadas nesse estudo em termos porcentagem molar quantitativa (*%molar*). A *%molar* foi calculada e convertida para mol a partir da relação entre o número de Avogadro e a porcentagem atômica (*%atômica*). O estudo foi realizado utilizando o *software* CasaXPS versão 2.3.19PR1.0.

Tabela 1. Razão Ca/P calculada via XPS para os pós de HA e Ga-HA sintetizados.

Amostra	%molar (10^{-23} mols)				Razão	
	O	Ca	P	Ga	Ca/P	(Ca+Ga)/P
HA	10,01	3,93	2,63	-	1,50	-
Ga-HA	4,90	3,02	2,32	0,98	1,30	1,72

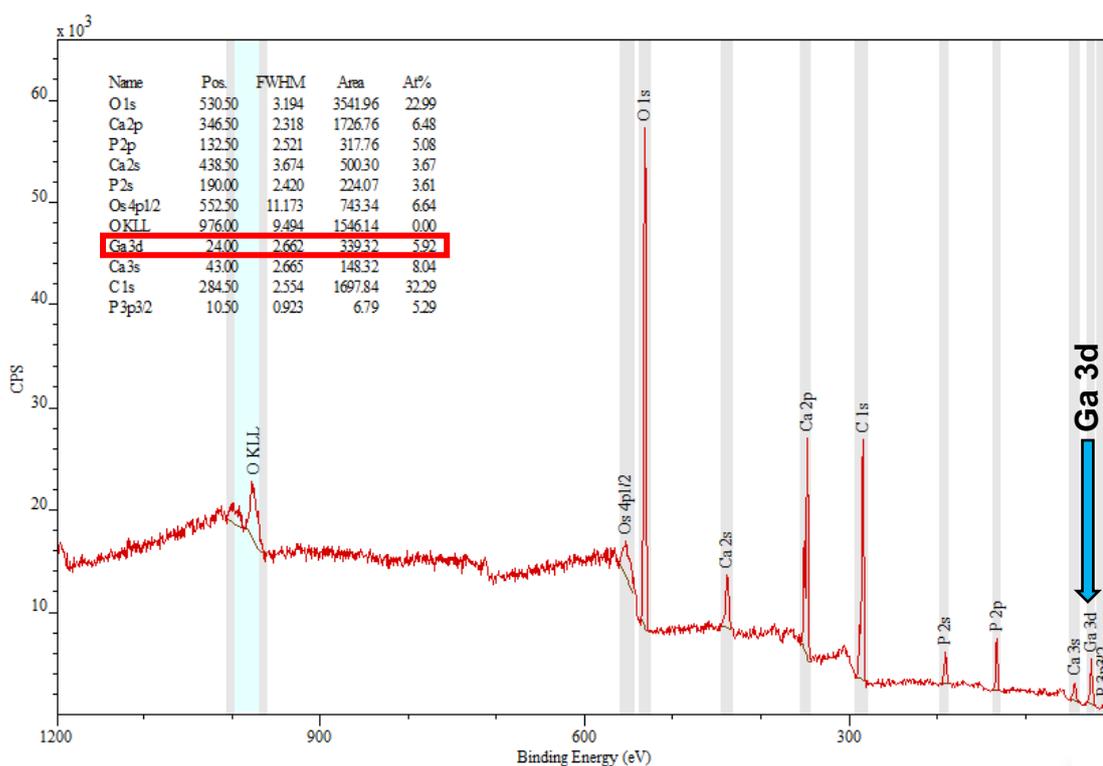


Figura 4. Porcentagem atômica dos componentes elementares que constituem a amostra Ga-HA. A quantificação foi realizada utilizando o *software* CasaXPS.

3.2 Caracterização dos compósitos e estudo da adsorção

Após caracterização e comprovação da obtenção da fase hidroxiapatita por meio do DRX e XPS, o material hidroxiapatita/clorexidina foram caracterizados pelas técnicas de DRX, FT-IR, TGA e FE-SEM/EDS. Para efeitos comparativos dos

possíveis efeitos positivos ou negativos da presença do Ga no compósito, a CLX também foi incorporada na HA seguindo a mesma metodologia de síntese de obtenção do material Ga-HA + CLX. A incorporação de CLX na HA por sólido-líquido foi estudada pela curva de variação de concentrações da CLX (Figura 5). Os resultados de incorporação (Tabela 2) foram calculados utilizando a Equação 1. A Figura 6 mostra os resultados das caracterizações via DRX, FTIR, TG e FE-SEM/EDS.

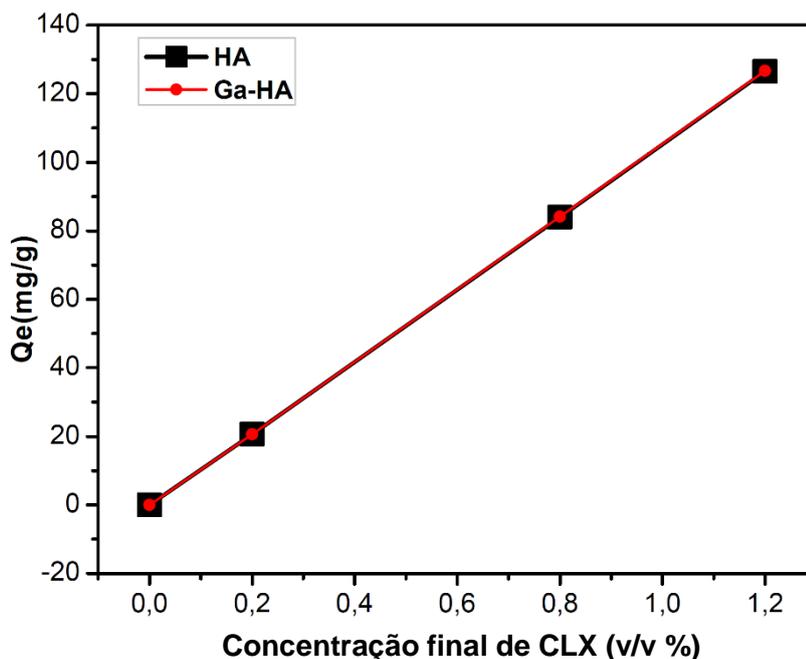


Figura 5. Curva de concentrações da CLX incorporação na hidroxiapatita.

Tabela 2. Resultados da incorporação da CLX calculados utilizando a Equação 1.

Biocompósito	Teórico em solução inicial (v/v %)	Quantidade adsorvida (mg/g)
HA/CLX-0,20	0,20	20,57
HA/CLX-0,80	0,80	83,96
HA/CLX-1,20	1,20	126,51
Ga-HA/CLX-0,20	0,20	20,63
Ga-HA/CLX-0,80	0,80	84,11
Ga-HA/CLX-1,20	1,20	126,66

A curva de concentrações mostrou os valores de CLX que foram incorporados nas HAs. Todos os materiais apresentam valores de adsorção próximos em suas concentrações adsorvidas de CLX. Foi observado que os materiais HA/CLX e Ga-HA/CLX contendo a menor concentração teórica de CLX (0,20% v/v) tiveram uma

concentração média de 0,0130 mg/g e 0,0132 mg/g, respectivamente, do fármaco adsorvido superficialmente. Para os compósitos HA/CLX-0,80 e Ga-HA/CLX-0,80 a concentração média de fármaco adsorvido foi 0,0112 mg/g e 0,0118 mg/g, respectivamente. Por fim, para os compósitos HA/CLX-1,20 e Ga-HA/CLX-1,20 essas concentrações foram 0,0144 mg/g e 0,0114 mg/g, respectivamente. Uma tendência linear e proporcional na curva de adsorção do fármaco ao interagir com a hidroxiapatita foi observada, sugerindo que as proporções de concentrações de CLX (0,20 a 1,20 % v/v) sugeridas nesse estudo foram seguidas.

O DRX do material (Figura 6a) se mostrou semelhante ao DRX da Ga-HA, apresentando apenas a diminuição da cristalinidade, acredita-se que a incorporação da CLX possa ter gerado essa diminuição da cristalinidade do material. Os espectros de FTIR dos compósitos e de ambos os precursores (Ga-HA e CLX) são mostrados na Figura 6b. O espectro da Ga-HA mostra a banda em 3500 cm^{-1} que é refere-se ao estiramento O-H da hidroxila característica da fase hidroxiapatita. Já bandas em 3440 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} , correspondem a estiramentos e deformações do tipo O-H de água adsorvida na superfície dos materiais. As bandas entre 1030 cm^{-1} a 960 cm^{-1} , corresponde a vibração de estiramento assimétrico e simétrico, relacionados a grupos PO_4^{3-} em HPO_4^{2-} . A banda em torno de 600 cm^{-1} é referente a deformação assimétrica tipo P-O do grupo PO_4^{3-} . Na região de 560 cm^{-1} tem-se a deformação do tipo P-OH e em 470 cm^{-1} , são mostradas bandas correspondentes as vibrações de deformações assimétricas do grupamento HPO_4^{2-} (P-O-(H)) (MALAKAUSKAITE-PETRULEVICIENE et al., 2016).

Para os espectros dos compósitos contendo CLX, além dos pontos em comum do espectro do material Ga-HA, outras modificações são percebidas, por exemplo, são observadas duas bandas de estiramentos discretas próximas a região de 3330 cm^{-1} e 2920 cm^{-1} nos espectros dos materiais contendo CLX, essas bandas não são visualizadas no espectro da Ga-HA. Esse fato se deve as interações dos grupos amina (N-H) e metilênicos (C-H), respectivamente, provenientes da CLX que foi incorporada com os grupos (OH) presentes na hidroxiapatita em 3500 cm^{-1} . Outra modificação observada é o alargamento da banda na região de 1530 a 1330 cm^{-1} , que se deve a deformação angular resultante dos grupos aminos da CLX incorporada. Percebe-se também a intensificação da banda em 830 cm^{-1} referentes a deformação angular fora

do plano do grupo C-H dos anéis aromáticos presentes na estrutura da CLX (CHIMIE et al., 2011; SUCI; GEESEY; TYLER, 2001).

A Figura 6c e 6d mostra as curvas TG das HAs e dos biocompósitos. Para os as cerâmicas (Figura 6c), o material dopado tem uma menor perda de massa percentual em comparação com a HA-pura. O primeiro evento térmico ocorreu em torno de 100 °C que é referente a água fisissorvida. Já entre a temperatura inicial até próximo de 200 °C foi observado um perca percentual de aproximadamente 2,5%, porém para a HA-pura esse percentual foi de cerca de 5,0%. Essas perdas de massa representam a saída de água adsorvida fisicamente na superfície do material que foi detectada na análise por FTIR, esse mesmo evento térmico é percebido nas amostras dos biocompósitos. É possível verificar também que a dopagem com o Ga aumentou a estabilidade térmica da Ga-HA. Essa mesma tendência foi observada para o biocompósito Ga-HA/CLX (Figura 6d), ocorrendo uma maior perda de massa para o material HA/CLX entre 200 °C a 600 °C. Assim, acredita-se que o Ga proporcione uma maior estabilidade aos materiais. Esse evento térmico corresponde a degradação térmica dos grupos voláteis orgânicos presentes na CLX (PRIYADARSHINI et al., 2017; RICARDO et al., 2017).

Por exemplo, entre 100 a 200 °C, os compósitos HA/CLX e Ga-HA/CLX apresentaram perda de massa de aproximadamente 12% e 5%, respectivamente. Outro evento térmico da região entre 200 a 400 °C, para ambos os compósitos HA/CLX e Ga-HA/CLX, foi observado uma perca cerca de 6% e 3%, respectivamente. Essa perca corresponde à saída dos demais grupos químicos da CLX. No quarto térmico entre 400 a 700 °C, ocorreu uma perda de massa de cerca de 3% e 1% para HA/CLX e Ga-HA/CLX, respectivamente. Essa perda pode ser atribuída aos demais grupos em decomposição pertencentes as clorexidina e, por fim, o último evento térmico foi observado entre 700 a 1000 °C que é relativo à condensação dos grupamentos OH pertencentes a estrutura da hidroxiapatita.

De acordo com esses resultados, logo pode-se verificar uma diminuição acentuada na estabilidade térmica do material ausente de Ga. Essa afirmativa é relevante devido a CLX ser uma molécula orgânica e, portanto, apresentar uma temperatura de degradação relativamente baixa; porém, essa temperatura é superior a 121 °C, que é a temperatura utilizada nos processos de autoclavagem. Portanto, assim assegurando a permanência do fármaco no material. A Figura 6e fornece

informações quanto a composição química qualitativa dos elementos presentes no compósito obtidas por EDS. Adicionalmente, a Figura 6f é referente a imagens do compósito Ga-HA/CLX obtidos por FE-SEM. A imagem mostra as partículas formando aglomerados não uniformes com superfície irregular.

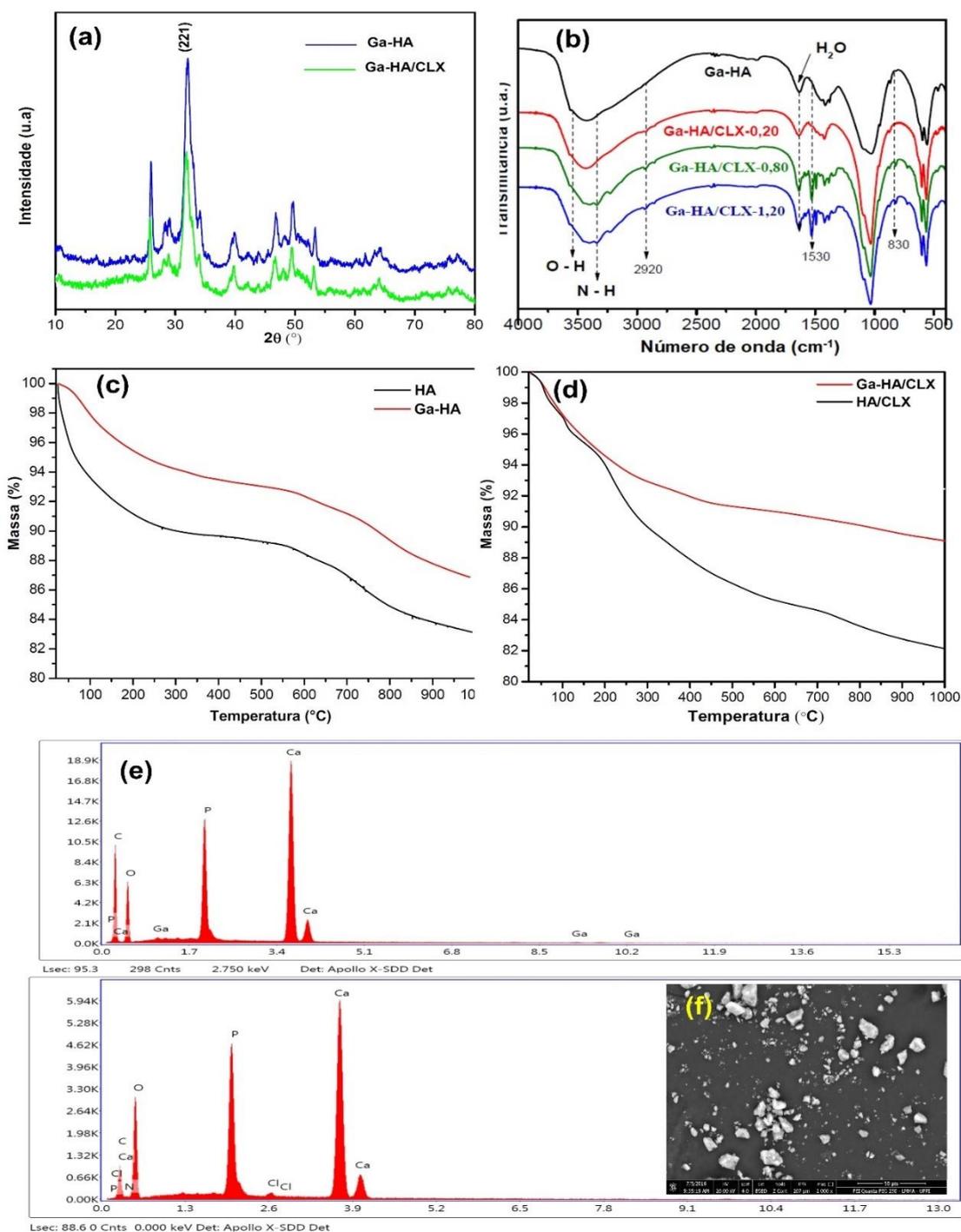


Figura 6. (a) DRX para Ga-HA e Ga/CLX (b) FTIR para Ga-HA e Ga/CLX, (c) e (d) curva TG para Ga-HA e Ga/CLX, (e) composição química qualitativa por e (f) FE-SEM para o compósito Ga-HA/CLX.

3.3 Estudos do efeito inibitório via MCD e efeitos de citotoxicidade

Os valores em porcentagem do efeito inibitório para cada tipo dos materiais obtidos frente as cepas bacterianas estão dispostas na Tabela 3. Para a avaliação e economia de materiais, escolheu-se os dois extremos de concentração de CLX adsorvidas nos materiais, ou seja, as concentrações teóricas de 0,20% v/v e 1,20% v/v. Os resultados mostraram que somente o compósito HA/CLX-0,20 não apresentou eficácia de 100% de inibição de crescimento bacteriano contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A Figura 7 apresenta as fotos das placas obtidas após ensaio de inibição bacteriana via MCD.

Vale ressaltar que a quantidade média em mg/g de CLX adsorvida para os materiais HA/CLX-0,20 e Ga-HA/CLX-0,20 foram rigorosamente próximas: 0,0130 mg/g e 0,0132 mg/g, respectivamente. Dessa forma, os resultados de inibição do crescimento bacteriano apontaram que existe melhoramento da atividade antibacteriana em virtude da presença do Ga e que os efeitos antibacterianos já conhecidos da CLX não estejam atuando com 100% de eficácia devido à baixa concentração do fármaco. Por exemplo, Moreira et al, demonstrou a eficácia da clorexidina a 0,12% v/v e 0,20% v/v; essas duas concentrações inibiram o crescimento das bactérias *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. aeruginosa* e *S. mutans* (MOREIRA et al., 2011) e, segundo Hortense et al, a CLX é eficaz no controle da placa bacteriana, atuando de forma preventiva e no tratamento de doenças bucais, com baixa toxicidade e mínimos efeitos colaterais (HORTENSE et al., 2017). Portanto, acredita-se que a presença do Ga possa ser um fator responsável pelo grau de potencialização dos efeitos inibitórios observado (cerca de 49% para a *E. coli* e 30% da *S. aureus*) do compósito formulados por Ga-HA+CLX.

Tabela 3. Resultados dos efeitos inibitórios dos compósitos contra cepas bacterianas.

Materiais	Efeito inibitório (%)	
	<i>E. coli</i> (ATCC 25,922)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25,923)
HA	3±4	7±2
HA/CLX-0,20	51±4	70±4
HA/CLX-1,20	100	100
Ga-HA	45±3	74±4
Ga-HA/CLX-0,20	100	100
Ga-HA/CLX-1,20	100	100

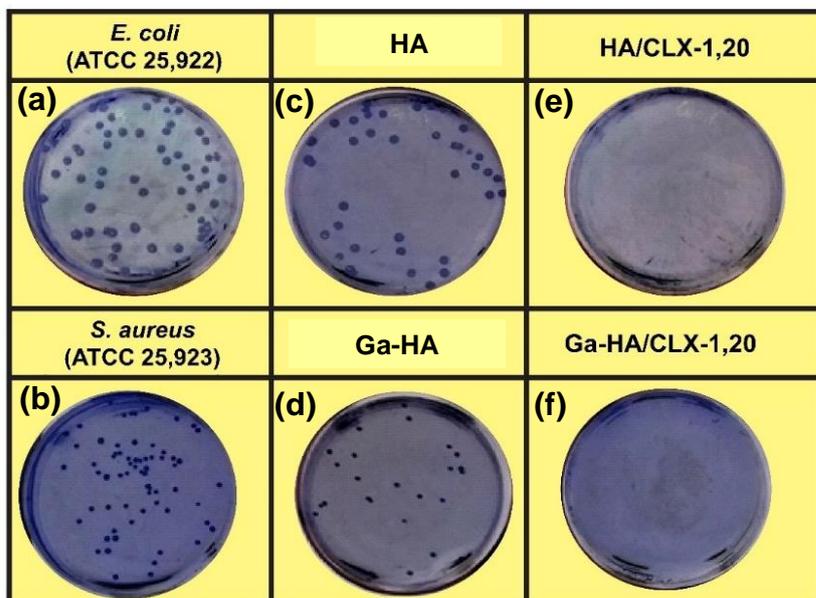


Figura 7. Imagens das placas do ensaio antibacteriano via MCD: (a e b) controles positivos (solução salina); (c e d) efeito inibitório dos pós HA e Ga-HA e (e e f) efeito inibitório dos materiais HA/CLX-1,20 e Ga-HA/CLX-1,20.

Esses resultados podem ser explicados pela ação antibacteriana do 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 (ANTUNES et al., 2012; CHITAMBAR, 2016). Suenaga e colaboradores apontaram que tal mecanismo possa ocorrer entre as interações do Ga presente na hidroxiapatita com os constituintes das paredes das células bacterianas, com a ocorrência de interações de oxirredução e/ou espécies reativas de oxigênio, promovendo assim, um desequilíbrio referente a permeabilidade da célula e, conseqüentemente, a ocorrência do apoptose (SUENAGA et al., 2015).

A ação antimicrobiana da CLX pode ser atribuída por prováveis interações entre os grupos catiônicos que constituem a estrutura química dos fármacos. Esses grupos são atraídos pela carga negativa da superfície bacteriana, fazendo que ocorram interações do tipo eletrostáticas, caracterizando-se pela adsorção da CLX na superfície da parede celular da bactéria. Esse fenômeno pode ser o responsável por provocar a lise celular, assim, por consequência, a morte desses microrganismos é ocasionada (SHEN et al., 2016).

A Figura 8 mostra os resultados do teste de citotoxicidade via ensaio calorimétrico MTT. O ensaio ocorreu com os materiais precursores (HA e Ga-HA) e os compósitos Ga-HA/CLX-0,20 e Ga-HA/CLX-1,20. O teste foi executado via extrato dos materiais com tempo de incubação de 24 h. Os resultados do metabolismo celular foram comparados com o controle negativo (DMEM + FBS 10% v/v) (100% de proliferação) e os grupos foram classificados como sendo (GUO et al., 2012): resultados acima de 80% são considerados não citotóxicos; aqueles entre 80 e 71%, fracamente citotóxicos; aqueles entre 70 e 61%, moderadamente citotóxico; e aqueles abaixo de 60%, fortemente. A Figura 8 mostra os resultados obtidos que foram expressos em densidade ótica (OD)×100 (Equação 5), obtidas por um espectrofotômetro em 570 nm.

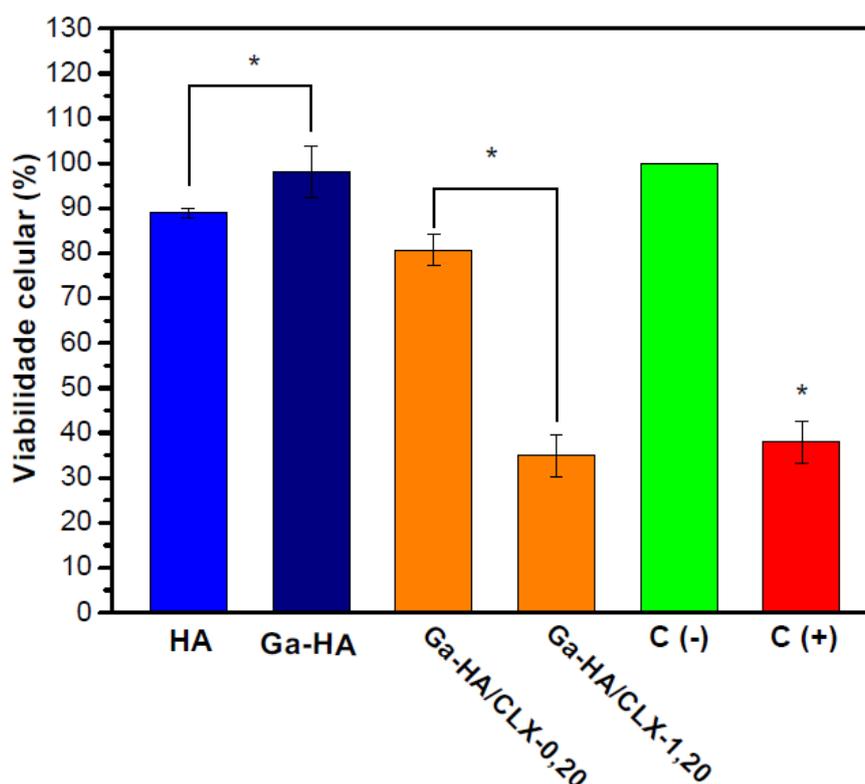


Figura 8. Resultados da viabilidade celular *in vitro* dos materiais sintetizados nesse estudo. Os resultados são expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle negativo (C-): DMEM + FBS a 10% v/v. O grupo controle positivo (C+) como referência de efeito citotóxico é composto por: DMEM + FBS 10% v/v + DMSO 30% v/v. Análise estatística: ANOVA ONE WAY e o teste post-hoc. * $p \leq 0,05$.

Os resultados de viabilidade celular avaliados apontaram que os materiais HA e Ga-HA tiveram níveis de viabilidade compatíveis com um efeito não citotóxico (viabilidade celular $\geq 80\%$). A análise estatística mostrou que os materiais cerâmicos HA e Ga-HA apresentaram níveis de viabilidade celular de $89\pm 1\%$ e $98\pm 6\%$, respectivamente, assim, uma similar ao grupo controle negativo (100%), com significativamente de $p \leq 0,05$, foi observado.

As partículas de HA e Ga-HA sintetizadas não interferiram na atividade metabólica celular e, conseqüentemente, na viabilidade celular. Em outras palavras, os materiais HA e Ga-HA foram classificados como não citotóxicos (inibição menor do que 20% em relação ao grupo controle). O material Ga-HA exibiu um efeito de proliferação celular, em comparação a HA, de cerca de 9% a mais. Acredita-se que essa potencialização dos efeitos de indução do crescimento celular se deva ao fato da presença do Ga nas partículas de hidroxiapatita. Melnikov et al., 2008, destacam que íons de gálio são clinicamente eficazes contra a reabsorção óssea e para o tratamento da osteoporose e hipercalcemia relacionada ao câncer. Ele aumenta e induz o crescimento do teor de cálcio e fósforo no osso e têm efeitos não tóxicos diretos em osteoclastos (MELNIKOV; MALZAC; COELHO, 2008).

Ao se avaliar os efeitos citotóxicos dos compósitos, foram observados que os materiais Ga-HA/CLX-0,20 e Ga-HA/CLX-1,20, apresentou viabilidade celular de $81\pm 3\%$ e $35\pm 5\%$, respectivamente. O material Ga-HA/CLX-0,20 foi classificado como sendo não citotóxicos e o Ga-HA/CLX-1,20 foi classificado como sendo fortemente citotóxicos. A análise da curva de incorporação de CLX na hidroxiapatita (Figura 5), combinada com os testes de atividade antimicrobiana e citotoxicidade, mostrou que a concentração necessária do fármaco para se atingir um efeito bactericida eficaz e não prejudicar os efeitos de não citotoxicidade do material, ao tempo que se evita concentrações elevadas de CLX e desperdício de fármaco foi de 20,63 mg/g. A concentração superior (126,66 mg/mg) mostrou-se ser fortemente citotóxica (efeito de proliferação celular $< 60\%$).

Segundo Souza et al., 2011, os resultados dos ensaios *in vitro* sinalizaram o potencial da utilização da associação da hidroxiapatita + clorexidina para procedimentos profiláticos ou terapêuticos como uma alternativa de antibióticos sistêmicos. A vantagem dessa associação é que ela combinou a bioatividade do Ga-HA como material de regeneração de tecidos duros com a atividade antimicrobiana

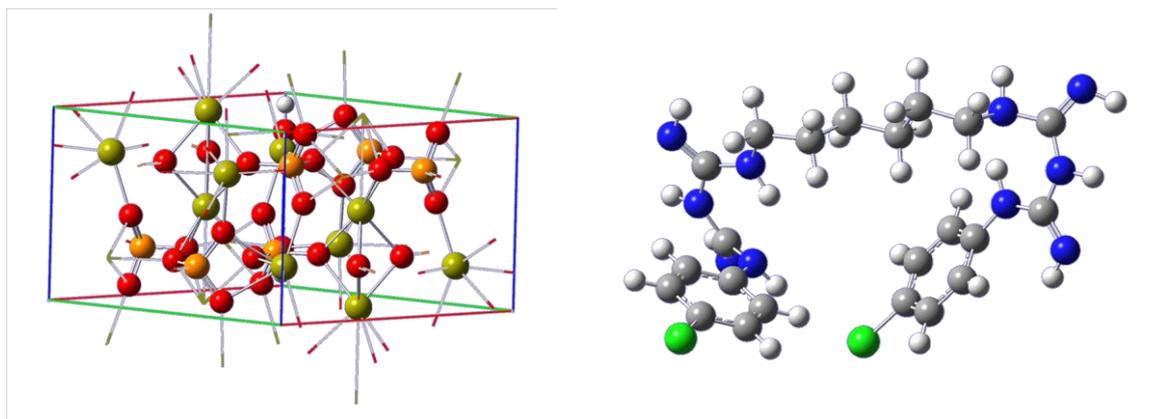
da CLX. Além disso, os efeitos da potencialização da viabilidade celular no material contendo gálio pode ter também influenciado na minimização de prováveis efeitos tóxicos da CLX. Portanto, um possível comportamento biocompatível foi observado no material Ga-HA/CLA-0,20; uma vez que a presença de CLX não prejudicou a viabilidade do hospedeiro celular (SOUZA et al., 2011).

3.4 Estudo teórico da interação entre a HA e CLX

Com a intenção de investigar alguns parâmetros termodinâmicos da interação entre a hidroxiapatita (HA) e clorexidina, um estudo computacional também foi realizado. A superfície da hidroxiapatita, em fase gasosa (ZHU; WU, 2004) e em meio aquoso (CHIATTI et al., 2016), já foi anteriormente estudada através de cálculos DFT, o que pode justificar a escolha por esse tipo de abordagem. Vale a pena destacar também que as propriedades vibracionais (intensidades no infravermelho) e estruturais da hidroxiapatita, não variam de modo significativo com a temperatura (KEBIROGLU et al., 2017).

Para representar a HA utilizou-se a os parâmetros da célula unitária que foram fornecidos por meio do refinamento pelo método de Rietveld. Os seguintes parâmetros da célula unitária foram utilizados para a construção do modelo teórico: estrutura do tipo hexagonal, grupo espacial P63/m e parâmetros de célula unitária $a = b = 0,943$ nm e $c = 0,690$ nm e $V = 531,39$ Å³ (Figura 3c). A geometria da clorexidina, no estado fundamental, foi obtida em nível B3LYP/CEP-31G(d). A Figura 9 mostra um esquema representativo das estruturas de HA e clorexidina utilizadas.

A Tabela 4 sumariza os resultados obtidos, em nível B3LYP/CEP-31G(d). A energia de interação $\Delta E_{int} = E_{conf(Int_n)} - [E_{HA} + E_{clorexidina}]$ é obtida através da diferença de energia de uma dada configuração ($E_{conf(Int_n)}$) do produto, e da soma das energias da hidroxiapatita (E_{HA}) e clorexidina ($E_{clorexidina}$) isoladas. Também são mostrados, valores de energia de Gibbs e um parâmetro ΔG_{int} que é calculado de modo análogo a ΔE_{int} . Para simplificar a discussão, se calculou ainda à estabilidade relativa das duas configurações mais estáveis encontradas durante a interação entre os sistemas HA + CLX.



Átomo de O (vermelho), átomo de P (laranja),
átomo de Ca (verde) e átomo de H (branco)

Hidroxiapatita: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$

Átomo de C (cinza), átomo de N (azul),
átomo de Cl (verde) e átomo de H (branco)

Clorexidina: $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$

Figura 9. Esquema representativo das estruturas de HA e clorexidina.

Durante a interação da HA com a CLX, que levou a formação da $conf(Int_1)$ (Figura 10a), observou-se a existência de uma coordenação entre o átomo de nitrogênio do grupo (-C=NH) na molécula de CLX com um dos átomos de cálcio na superfície da HA, sendo à distância de ligação N–Ca da ordem de 2,41 Å. No entanto, como a molécula de clorexidina é simétrica pode acontecer também uma nova coordenação do grupo (-C=NH) oposto presente na molécula de clorexidina com átomos de cálcio da superfície da HA, o que leva a formação da $conf(Int_2)$.

Tabela 4. Energia eletrônica total (0 K) e variação da energia de Gibbs (298,15 K) em unidade arbitrária (u.a.), energia de interação (ΔE_{int} ou ΔG_{int}) e estabilidade relativa (E.R.) das n -configurações obtidas em kcal mol^{-1} .

Sistema	Energia Eletrônica (u.a.)	ΔE_{int} (kcal mol^{-1})	E.R. (kcal mol^{-1})	Energia de Gibbs (u.a.)	ΔG_{int} (kcal mol^{-1})	E.R. (kcal mol^{-1})
Fase gasosa						
<i>clorexidina</i>	-271,1696975	-	-	-270,719316	-	-
<i>HA</i>	-465,1688085	-	-	-465,111490	-	-
$conf(Int_1)$	-736,3978161	-37,2	68,1	-735,867987	-23,3	65,8
$conf(Int_2)$	-736,5063701	-105,3	0,0	-735,972772	-89,1	0,0
Fase aquosa obtida com PCM						
<i>clorexidina</i>	-271,2020083	-	-	-270,756745	-	-
<i>HA</i>	-465,433052	-	-	-465,389936	-	-
$conf(Int_1)$	-736,662368	-17,1	41,3	-736,144403	1,4	38,8
$conf(Int_2)$	-736,7281186	-58,4	0,0	-736,206253	-37,4	0,0

E.R. = estabilidade relativa

Nesse último caso, as coordenações não simultâneas, ocorrem ainda com a migração de um átomo de hidrogênio, de um dos grupos (-NH) vizinho ao grupo (-C=NH) que é capturado por um dos átomos de oxigênio da superfície da HA. Como pode ser observado na Tabela 5, a $conf(Int_2)$ (Figura 10b) é aproximadamente 68 kcal mol⁻¹ mais estável em relação àquela que ocorre apenas uma única coordenação N–Ca e 66 kcal mol⁻¹ ao se analisar o ΔG_{int} em fase gasosa. Desta forma, pode-se afirmar que as interações entre hidroxiapatita e a clorexidina são termodinamicamente favoráveis e que a inclusão do modelo implícito de solvente muda de forma significativa à energia do sistema.

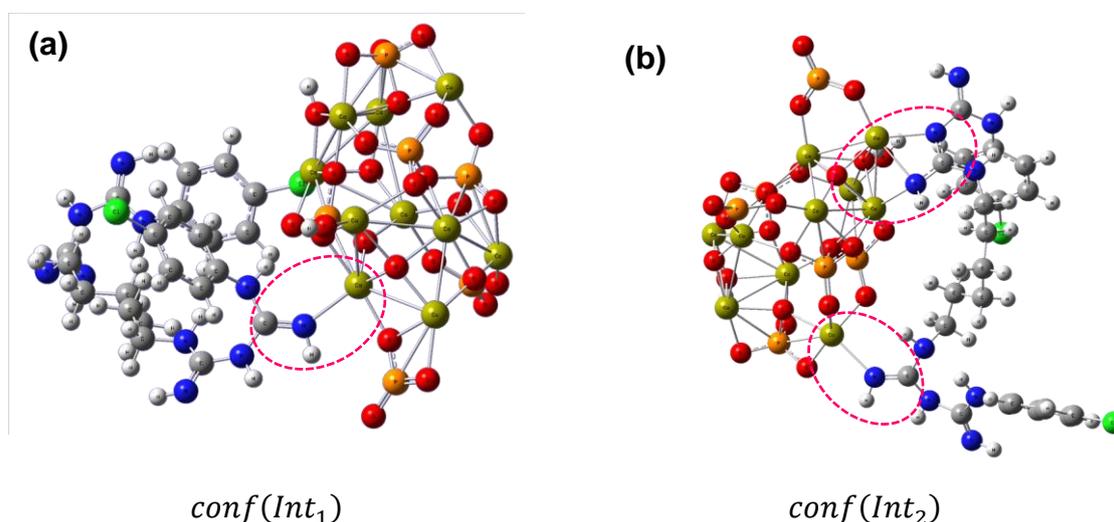


Figura 10. Configurações mais favoráveis termodinamicamente para as duas configurações calculadas entre a interação da CLX com a HA.

A Figura 11 mostra o espectro-teórico calculado da HA e clorexidina isoladas, bem como das $conf(Int_1)$ e $conf(Int_2)$, e traça um paralelo entre os FT-IRs obtidos experimentalmente para os compósitos (HA/CLX ou Ga-HA/CLX) e o pó de HA sintetizados nesse trabalho. Ao calcular o espectro teórico da CLX (Figura 11a), bandas entre as regiões entre 3800 a 2800 cm⁻¹ são observadas, essa região do espectro é referente às vibrações de estiramento de grupos N-H presentes na estrutura da CLX. No espectro calculado do compósito (Figura 11c), essas bandas também são observadas, porém com uma menor intensidade, uma vez que a CLX está em baixa concentração em relação ao adsorvente.

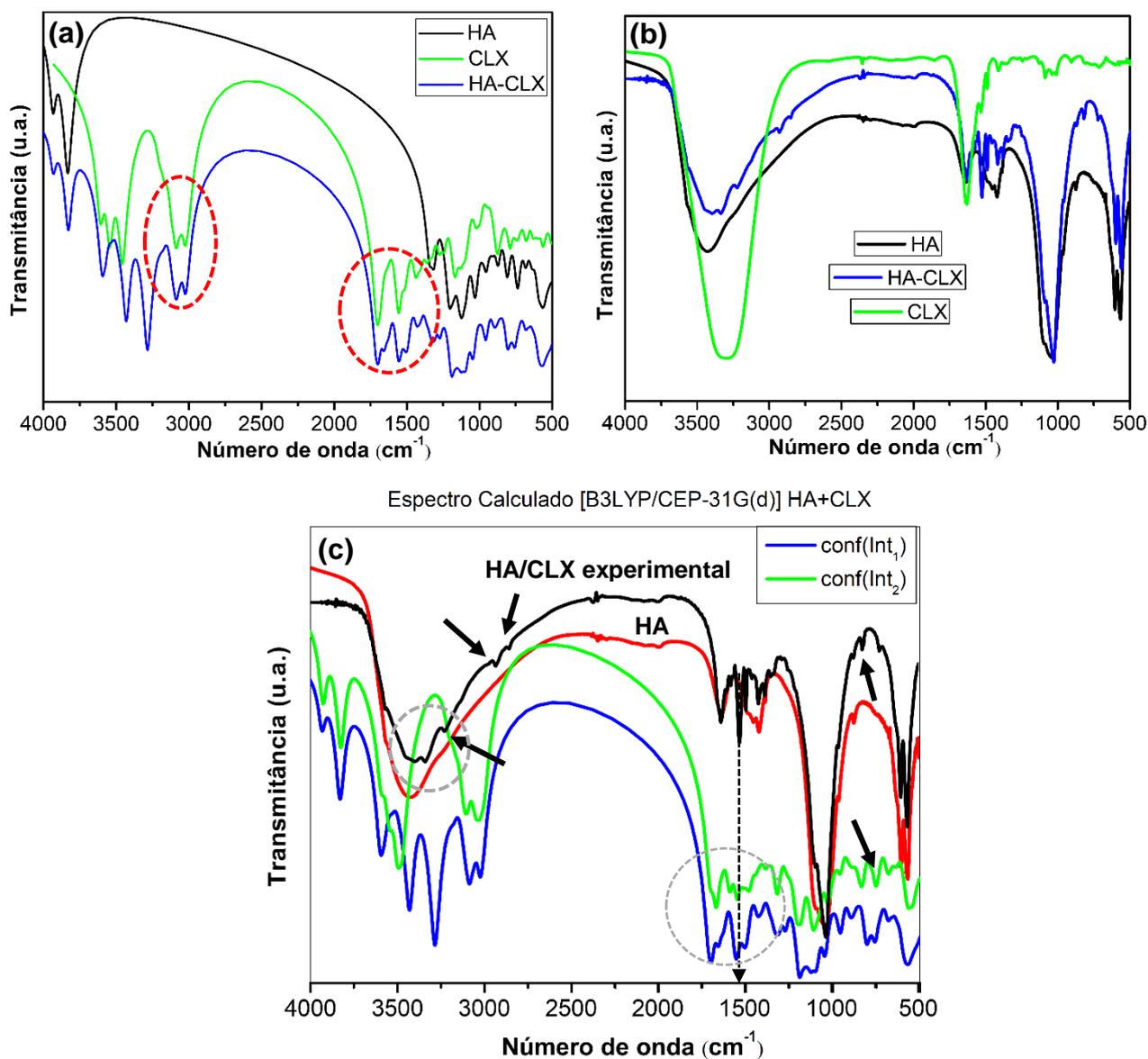


Figura 11. (a) Espectros de FTIR-teórico calculado da HA, HA/CLX e CLX isolados, (b) espectros experimentais da HA, HA/CLX e CLX e (c) espectros de FT-IR teórico das $conf(Int_1)$, $conf(Int_2)$, espectro experimental do compósito HA/CLX e espectro experimental da HA.

As vibrações de C=C dos anéis aromáticos e de C-H que compõe a CLX também surgiram nos espectros teórico e experimental (Figura 9b) da CLX(HOLEŠOVÁ et al., 2015; LOHAR et al., 2016), porém, nesse último, apareceram sobrepostas nesta região. Na região compreendida entre 1700 a 1300 cm^{-1} , nos espectros da $conf(Int_1)$ e $conf(Int_2)$, bandas correspondentes à deformação angular simétrica do plano como também dobramentos dos grupos N-H e C-H foram simuladas

e também foram observadas no espectro experimental do compósito (LOHAR et al., 2016), porém com picos de baixíssima intensidade mais uma vez justificada pela quantidade de CLX no sistema.

Nessa mesma região, agora para espectro experimental do compósito, são observados banda correspondente à deformação angular simétrica do plano como também deformações dos grupos aminos e hidroxilas. Na região entre 1550 a 1530 cm^{-1} apareceram as bandas referentes à deformação de grupos CH_2 . Essas bandas presentes estão presentes em todas as configurações teóricas e experimentais que contem a CLX e encontram-se ausentes nos espectros teórico e experimentais da hidroxiapatita. Por fim, na região entre 960 a 820 cm^{-1} , observou-se as bandas referentes à vibração Cl-C (cloro ligado ao anel aromático) e bandas provenientes dos anéis aromáticos para-dissubstituídos estão presentes em todas as configurações teóricas e experimentais que contem a CLX (LOHAR et al., 2016).

Embora a metodologia empregada não seja a mais rigorosa para um estudo mais aprofundado envolvendo a HA, os resultados obtidos em nível B3LYP/CEP-31G(d) mostram uma termodinâmica de interação favorável com a clorexidina que ocorre mediante coordenação do átomo de N do grupo ($-\text{C}=\text{NH}$) da CLX com átomos de cálcio da superfície da HA. Observa-se também uma boa concordância entre os espectros experimentais e calculados.

4. CONCLUSÃO

O estudo da incorporação da CLX na HA revelou a possibilidade da síntese de um biocompósito que possa unificar as propriedades antimicrobianas do fármaco, mais as aplicações da HA em regiões compatíveis com tecido dentário do organismo humano. As técnicas DRX, XPS, FTIR, TG e FE-SEM/EDS, confirmaram o sucesso da síntese da HA, a presença do Ga, como também a eficiência da incorporação da CHX e a síntese eficiente do compósito. Os testes antimicrobianos de contato direto contra *S. aureus* e *E. coli* mostraram eficácia de 100% em todos os compósitos contendo Ga, sintetizados frente a essas duas cepas, ressaltando que a quantidade de CHX que mostrou eficaz na ação antimicrobiana foi de 0,20% v/v, muito abaixo da encontrado comercialmente. Os resultados do MTT revelaram que a incorporação do gálio na estrutura da HA, potencializou o grau de biocompatibilidade dos materiais sintetizados. O compósito Ga-HA/CLX-0,20 foi classificado, após 24 h de tempo de incubação celular, como sendo não citotóxico. Os valores termodinâmicos e a

similaridade encontrada entre os espectros FTIR teóricos e experimentais nas simulações computacionais via DFT, mostraram a existência de duas configurações de interações possíveis e com termodinâmica favorável. A $conf(Int_2)$ foi aproximadamente 68 kcal mol^{-1} mais estável em relação a $conf(Int_1)$, que ocorre apenas com uma coordenação do N da CLX com o Ca superficial da HA. Em outras palavras, é possível afirmar que o compósito Ga-HA/CLX é formado via interação química mediante coordenação do átomo de N do grupo (-C=NH) da CLX com átomos de cálcio da superfície da HA. Portanto, a $conf(Int_2)$ é a mais favorável para o sistema estudado nesse trabalho. Assim, desenvolveu-se um biocompósito com potencial de ser utilizado como enchimento de pequenas partes da arcada dentária, maxilar ou para outras aplicações na área da engenharia tecidual óssea.

5. REFERÊNCIAS

- ALJABO, A. et al. Development of dental composites with reactive fillers that promote precipitation of antibacterial-hydroxyapatite layers. **Materials Science and Engineering C**, v. 60, p. 285–292, 2016.
- ANTUNES, L. C. S. et al. In Vitro and In Vivo antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrug-resistant acinetobacter baumannii. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5961–5970, 2012.
- ARUL, K. T. Novel multifunctional of magnesium ions (Mg^{2+}) incorporated calcium phosphate nanostructures. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 730, p. 31–35, 2018.
- BECKE, A. D. Densityfunctional thermochemistry . III . The role of exact exchange Density-functional thermochemistry . III . The role of exact exchange. **J. Chem. Phys.**, v. 98, n. 1993, p. 5648–5652, 1993.
- BELLIS, C. A. et al. Glass ionomer cements functionalised with a concentrated paste of chlorhexidine hexametaphosphate provides dose-dependent chlorhexidine release over at least 14 months. **Journal of Dentistry**, v. 45, p. 53–58, 2016.
- BURKE, K. Burke, K. **The ABC of DFT**, 2007. Disponível em: <<https://dft.uci.edu/doc/g1.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2019.
- CARLI, R.; BIANCHI, C. L. XPS analysis of gallium oxides. **Applied Surface Science**, v. 74, n. 1, p. 99–102, 1994.
- CHEN, F. M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 86–168, 2016.
- CHIATTI, F. et al. Water at hydroxyapatite surfaces: the effect of coverage and surface termination as investigated by all-electron B3LYP-D* simulations. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 135, n. 3, p. 1–15, 2016.
- CHIMIE, R. R. DE et al. Characterization and in Vitro Release of Chlorhexidine. **Revue Roumaine De Chimie**, v. 56, n. 1, p. 65–71, 2011.

- CHITAMBAR, C. R. Gallium and its competing roles with iron in biological systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 8, p. 2044–2053, 2016.
- CURREY, J. D. Hierarchies in biomineral structures. **Science**, v. 309, n. 5732, p. 253–254, 2005.
- DACULSI, G. et al. Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes. **Irbm**, v. 34, n. 4–5, p. 346–348, 2013.
- DUTT, P.; RATHORE, P. K.; KHURANA, D. Chlorhexidine - An antiseptic in periodontics. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 13, n. 9, p. 85–88, 2014.
- FRISCH, M. J. et al., Gaussian 2009 Revision D.01, 2009.
- GELJIC, I. V et al. Gallium enhances reconstructive properties of a calcium phosphate bone biomaterial. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 2, p. e854–e866, 2018.
- GOMES, D. S. et al. A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine. **Cerâmica**, v. 65, n. 374, p. 282–302, 2019.
- GUO, B. et al. Electroactive porous tubular scaffolds with degradability and non-cytotoxicity for neural tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 144–153, 2012.
- HOLEŠOVÁ, S. et al. Antibacterial Polyethylene/clay Nanocomposites Using Chlorhexidine as Organic Modifier. **Materials Today: Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 246–252, 2015.
- HORTENSE, S. R. et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na Odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 22, n. 2, p. 178, 2017.
- HUANG, Z. et al. Incorporation of strontium into hydroxyapatite via biomineralization of collagen fibrils. **Ceramics International**, v. 41, n. 7, p. 8773–8778, 2015.
- KATTIMANI, V. S.; KONDAKA, S.; LINGAMANENI, K. P. Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. **Bone and Tissue Regeneration Insights**, v. 7, p. BTRI.S36138, 2016.
- KEBİROĞLU, M. H. et al. Temperature dependent structural and vibrational properties of hydroxyapatite: A theoretical and experimental study. **Ceramics International**, v. 43, n. 17, p. 15899–15904, 2017.
- KIM, H. et al. Optimized Zn-doped hydroxyapatite/doxorubicin bioceramics system for efficient drug delivery and tissue engineering application. **Ceramics International**, v. 44, n. 6, p. 6062–6071, 2018.
- KLUK, E.; REINHOLD, F. C. B. C.; PEREIRA, N. Uma Abordagem Sobre a Clorexidina: Ação Antimicrobiana E Modos De Aplicação. **Revista Gestão & Saúde**, v. 14, n.1, n. ISSN 1984-815, p. 7–13, 2016.
- KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical Review**, v. 140, p. 1133–1138, 1965.

- KOLEKAR, T. V. et al. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with aluminium: A potential carrier for biomedical applications. **Ceramics International**, v. 42, n. 4, p. 5304–5311, 2016.
- KOROWASH, S. I. et al. Selenium-substituted hydroxyapatite nanoparticles and their in vitro interaction on human bone marrow-And umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. **InterCeram: International Ceramic Review**, v. 66, n. 6, p. 244–250, 2017.
- LALA, S. et al. Magnesium substitution in carbonated hydroxyapatite: Structural and microstructural characterization by Rietveld's refinement. **Materials Chemistry and Physics**, v. 170, p. 319–329, 2016.
- LAMKHAO, S. et al. Synthesis of Hydroxyapatite with Antibacterial Properties Using a Microwave-Assisted Combustion Method. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.
- LEAL, R. C.; CUSTODIO, R. G3(MP2)//B3-SBK: A revision of a composite theory for calculations of thermochemical properties including some non-transition elements beyond the fourth period. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1149, n. November 2018, p. 1–7, 2019.
- LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Chemical Physics Letters**, v. 162, n. 3, p. 165–169, 1989.
- LOHAR, R. J. et al. FT-IR Spectrophotometric Analysis of chlorhexidine hydrochloride and its pharmaceutical formulations. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 9, p. 1702–1705, 2016.
- MALAKAUSKAITE-PETRULEVICIENE, M. et al. Characterization of sol-gel processing of calcium phosphate thin films on silicon substrate by FTIR spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 85, p. 16–21, 2016.
- MARIAPPAN, A. et al. Structural, Optical and Antimicrobial Activity of Copper and Zinc Doped Hydroxyapatite Nanopowders using Sol-Gel Method. **Mechanics, Materials Science & Engineering Journal**, v. 9, n. 1, 2017.
- MELNIKOV, P. et al. Gallium-containing hydroxyapatite for potential use in orthopedics. **Materials Chemistry and Physics**, v. 117, n. 1, p. 86–90, 2009.
- MELNIKOV, P. et al. Evaluation of in vitro toxicity of hydroxyapatite doped with gallium. **Materials Letters**, v. 253, p. 343–345, 2019.
- MELNIKOV, P.; MALZAC, A.; COELHO, M. D. B. Gallium and bone pathology. **Acta Ortopedica Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 54–57, 2008.
- MOMMA, K.; IZUMI, F. VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data. **Journal of Applied Crystallography**, v. 44, n. 6, p. 1272–1276, 2011.
- MOREIRA, A. C. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 68, n. 1, p. 91–94, 2011.
- MORGON, N. H.; CUSTÓDIO, R. Teoria do Funcional de Densidade. **Química**

Nova, v. 18, n. 1, p. 44–55, 1995.

PANDEY, A. et al. Antioxidant and antibacterial hydroxyapatite-based biocomposite for orthopedic applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 88, n. January, p. 13–24, 2018.

PANPALIYA, N. P. et al. In vitro evaluation of antimicrobial property of silver nanoparticles and chlorhexidine against five different oral pathogenic bacteria. **Saudi Dental Journal**, v. 31, n. 1, p. 76–83, 2019.

PRETTI, H. et al. Effect of chlorhexidine varnish on gingival growth in orthodontic patients: A randomized prospective split-mouth study. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 20, n. 5, p. 66–71, 2015.

PRIYADARSHINI, B. M. et al. Characterization of chlorhexidine-loaded calcium-hydroxide microparticles as a potential dental pulp-capping material. **Bioengineering**, v. 4, n. 3, 2017.

RICARDO, N. et al. Gelatin as a Chlorhexidine Digluconate Immobilizing Agent. **MOJ Polymer Science**, v. 1, n. 5, p. 1–4, 2017.

SAFARZADEH, M. et al. Effect of multi-ions doping on the properties of carbonated hydroxyapatite bioceramic. **Ceramics International**, v. 45, n. 3, p. 3473–3477, 2019.

SANTOS, M. V. B. DOS et al. Desenvolvimento de biomaterial composto por hidroxiapatita e clorexidina para aplicação na cavidade oral. **Cerâmica**, v. 65, n. 373, p. 130–138, 2019.

SHEN, Y. et al. Experimental and Theoretical Investigation of Multispecies Oral Biofilm Resistance to Chlorhexidine Treatment. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–13, 2016.

SIDDIQUI, H. A.; PICKERING, K. L.; MUCALO, M. R. A review on the use of hydroxyapatite- carbonaceous structure composites in bone replacement materials for strengthening purposes. **Materials**, v. 11, n. 10, p. 1–32, 2018.

SINGH, R. P. et al. Structural Analysis of Silver Doped Hydroxyapatite Nanopowders by Rietveld Refinement. **Transactions of the Indian Institute of Metals**, v. 70, n. 8, p. 1973–1980, 2017.

SOUZA, C. A. S. DE et al. Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 310–318, 2011.

SUCI, P. A.; GEESEY, G. G.; TYLER, B. J. Integration of Raman microscopy, differential interference contrast microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy to investigate chlorhexidine spatial and temporal distribution in *Candida albicans* biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, n. 3, p. 193–208, 2001.

SUENAGA, H. et al. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 11, p. 1–9, 2015.

TAVARES, D. DOS S. et al. Incorporation of strontium up to 5 Mol. (%) to hydroxyapatite did not affect its cytocompatibility. **Materials Research**, v. 14, n. 4, p.

456–460, 2011.

TITE, T. et al. Cationic substitutions in hydroxyapatite: Current status of the derived biofunctional effects and their in vitro interrogation methods. **Materials**, v. 11, n. 11, p. 1–62, 2018.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum mechanical continuum solvation models. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 8, p. 2999–3093, 2005.

TSAI, S. W. et al. Fabrication and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite-CaO-CaCO₃ nanofibers with a mesoporous structure as drug delivery carriers. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, 2018.

VIEIRA, E. G. et al. Síntese pelo método da coprecipitação e caracterização estrutural do tungstato de cálcio com estrutura tipo scheelita (Synthesis by the coprecipitation method and structural characterization of. v. 59, p. 417–425, 2013.

WAHL, D. A.; CZERNUSZKA, J. T. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. **European Cells and Materials**, v. 11, p. 43–56, 2006.

WANG, Q. et al. Experimental and simulation studies of strontium/fluoride-codoped hydroxyapatite nanoparticles with osteogenic and antibacterial activities. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, n. June, p. 110359, 2019.

WEBSTER, T. J. et al. Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations. **Biomaterials**, v. 25, n. 11, p. 2111–2121, 2004.

WEINER, S.; WAGNER, H. D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. **Annual Review of Materials Science**, v. 28, n. 1, p. 271–298, 1998.

ZATSEPIN, D. A. et al. Atomic structure, electronic states, and optical properties of epitaxially grown β -Ga₂O₃ layers. **Superlattices and Microstructures**, v. 120, n. May, p. 90–100, 2018.

ZHU, W.; WU, P. Surface energetics of hydroxyapatite: A DFT study. **Chemical Physics Letters**, v. 396, n. 1–3, p. 38–42, 2004.

CAPÍTULO 3: ESTUDO EXPERIMENTAL

Hidroxiapatita dopada com cério: investigação das suas propriedades antibacteriana e de citotoxicidade

Resumo

A hidroxiapatita (HA) é uma cerâmica biocompatível que estimula o crescimento ósseo. Assim, uma das alternativas para potencializar algumas das suas propriedades biológicas é a inserção de alguns íons substituintes ou dopantes na sua rede cristalina como, por exemplo, o íon cério (Ce^{3+}). Nesse estudo, buscou-se investigar os efeitos de potencialização das propriedades antibacterianas e citotóxicas da dopagem da HA com o Ce (Ce-HA). A síntese da Ce-HA ocorreu via método da precipitação química, sem a utilização da etapa de calcinação. Os resultados de caracterização por DRX revelaram uma similaridade com o padrão JCPDS 001-1008 e ausência de fases intermediárias. O refinamento de Rietveld confirmou a existência de um perfil cristalino semelhante ao cartão ICSD nº 26205, de estrutura hexagonal e grupo espacial P63/m. A caracterização por FTIR, EDS e XPS confirmaram a presença cério nas formas Ce^{3+} e Ce^{4+} e a razão Ca/P variou entre 1,44 a 1,56. As hidroxiapatitas sintetizadas nesse estudo foram classificadas como sendo deficiente em cálcio. Após constatação da fase cristalina, as propriedades biológicas de inibição de crescimento contra colônias de bactérias e a proliferação celular *in vitro* foram avaliadas. O teste antibacteriano por contato direto contra *S. aureus* e *E. coli* mostrou eficácia de inibição do material contendo Ce igual a 45%. Com o ensaio de citotoxicidade via MTT, constatou-se que a presença do Ce foi fator potencializador dos efeitos de viabilidade celular, atingindo valores superiores a 80% de confluência celular, sendo classificados como sendo não-tóxicos. Portanto, o estudo da incorporação do Ce mostrou-se favorável à junção a potencialização das propriedades antibacterianas e antimicrobianas da cerâmica Ce-HA.

Palavras-chave: hidroxiapatita, dopagem, cério, preenchimento ósseo, preenchimento dentário.

1. INTRODUÇÃO

A hidroxiapatita sintética (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$, é considerada uma substância inorgânica que tem uma estrutura cristalográfica e química que se assemelha muito ao da apatita que compõe o osseo mineral (SOBIERAJSKA et al., 2018), que é tipicamente composto por 25 a 75% em peso (DOROZHKIN, 2007). Assim, a HA tem as suas principais aplicações voltadas para reparo e reconstrução de tecidos duros vivos danificados, que incluem a dentina, o esmalte e os ossos (NEEL et al., 2016). Portanto, a HA é uma biocerâmica muito usada nesses procedimentos de reparação óssea por apresenta propriedades biológicas favoráveis como a biocompatibilidade (PU'AD et al., 2019), ser um material bioativo, osteocondutor, osteogênico e osteoestimulante (GRADO et al., 2018).

Dentro desse contexto, essa biocerâmica pode ser modificados com incorporação de íons e, por consequência, essas incrementações podem acarretar em melhoramentos e potencializações de suas características físico-químicas, mecânicas, citocompatibilidade, solubilidade, bioatividade e propriedades (GOMES et al., 2019; KOLMAS; GROSZYK; KWIATKOWSKA-RÓZYCKA, 2014). Assim, esse objetivo pode ser alcançado por meio da adição de dopantes (YASUKAWA et al., 2012) e, por consequência, maiores taxas de aceitação dessa biocerâmica em implantes *in vivo* (LI et al., 2018; MROZ et al., 2015).

Por exemplo, Kim e colaboradores confirmaram que a associação do Zn^{2+} a nano-HA causam efeitos não tóxicos e potencializaram a atividade de proliferação celular *in vitro* (KIM et al., 2018). Outros estudos com HA dopado com Mg (REN et al., 2010), Sr (FRASNELLI et al., 2017), Ag e Au (KUMAR et al., 2019) mostraram efeitos satisfatórios na regeneração óssea causadas por osteoporose em modelo animal.

Vale destacar que a inserção de íons dopantes dentro dos parâmetros de rede da HA podem acarretar também efeitos pontuais de mudanças na sua cristalinidade (SAFARZADEH et al., 2019), aumento o nível de interação entre a HA e a biomineralização tecidual (HUANG et al., 2015), uma vez que a estrutura óssea não é composta somente por uma fase mineral inorgânica, mas também por uma matriz orgânica, constituída principalmente por colágeno e polipeptídios (CURREY, 2005; WEINER; WAGNER, 1998).

Assim, o íon cério (Ce), por exemplo, pode ser uma das alternativas como substituinte do cálcio (Ca^{2+}) nos parâmetros de rede da HA, pois é caracterizado por

possuir os seus orbitais 5d e 4f semipreenchido e, dependendo do ambiente químico, o Ce pode sofrer oxidação e atingir as valências +3 e +4 (LEE et al., 2012); logo, o Ce pode agir de maneira semelhante ao Ca^{2+} , podendo se acumular nos ossos em pequenas quantidades e estimular a atividade metabólica nos organismos vivos (RAJESWARI et al., 2014).

Por exemplo, Hu et al (2017), sugerem que o $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ participam na regulação da migração e diferenciação osteogênica de células mesenquimais do estroma da medula óssea (BMSCs) (HU et al., 2014). Um estudo *in vitro* de algumas propriedades biológicas, tais como, hemocompatibilidade, atividade antibacteriana e biocompatibilidade da HA dopada com diferentes concentrações de íon cério (Ce) (0,5 a 1,25%) demonstraram a natureza compatível do material com o sangue humano (< 5% de relação hemolítica) e excelente eficiência de inibição de patógenos para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (PRIYADARSHINI; ANJANEYULU; VIJAYALAKSHMI, 2017).

Phatai et al (2018), relataram que essa capacidade única de alternância no seu número de oxidação pode fazer com que o Ce, por meio de mecanismos chamados de redox ativo, possa exibir ao material atividades antibacterianas e antioxidantes (PHATAI et al., 2018). A união dessas propriedades junto a HA faz com que os materiais contendo Ce possam ter suas aplicações voltadas para áreas medicinais e odontológicas por favorecer alguns dos mecanismos de crescimento ósseo (PRIYADARSHINI; VIJAYALAKSHMI, 2018).

Logo, o grande desafio é a obtenção de uma biocerâmica que possa ser utilizada em seu formato particulado ou nas suas formas associadas, que possam reduzir a incidência de infecções *in situ*, minimizar efeitos adversos de não aceitação do material ao ser implantado e que esse material possua a capacidade de estimular o crescimento tecidual ósseo e a rápida recuperação do paciente em recuperação.

Dessa maneira, o presente trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar partículas de hidroxiapatita dopada com cério (0,50% m/m) (Ce-HA) para investigar suas propriedades antibacterianas contra duas cepas de bactérias (gram-positiva e gram-negativa) e avaliar a potencialização dos efeitos de viabilidade celular do material contendo cério para aplicações nas áreas da engenharia tecidual óssea.

2. METODOLOGIA

2.1 Materiais

Para a realização da síntese da HA e Ce-HA foram utilizados os seguintes reagentes: hidróxido de cálcio (Vetec), $\text{Ca}(\text{OH})_2$; fosfato de amônio dibásico (Neon), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e nitrato de cério ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$) (Sigma-Aldrich). Os reagentes não passaram por processo de purificação prévia e a água utilizada para os processos de síntese foi obtida pela purificação em um sistema Milli-Q (Millipore Corporation). Para os experimentos de viabilidade celular utilizou-se a linhagem celular GM07492 (fibroblasto humano), células/poço: 1×10^5 , meio de cultura DMEM (Gibco/Thermofisher), suplementado com soro bovino fetal (SBF) (nutricell), DMSO (Sigma-Aldric), penicilina e estreptomicina 10U/mL (Sigma-Aldrich).

2.2 Síntese das hidroxiapatitas

2.2.1 Sínteses da hidroxiapatita pura (HA)

A síntese da hidroxiapatita foi realizada pelo método da precipitação química (MPQ) (PANDEY et al., 2018), utilizando como reagentes precursores soluções de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, nas quantidades estequiometricamente determinadas de acordo com os valores da razão molar Ca/P próximo a 1,67 (Equação 1).

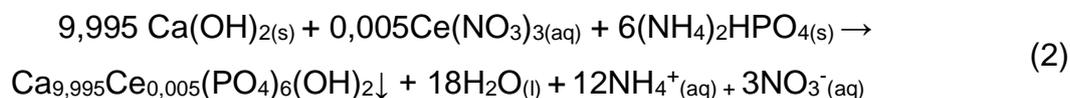


Para a síntese da HA, deixou-se sob agitação, em 50 mL de água deionizada, a massa de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ até que a mesma fosse completamente dissolvida. Posteriormente, ocorreu a adição do $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ dissolvido em 50 mL de água deionizada. A síntese ocorreu à temperatura ambiente, sob agitação, durante aproximadamente 3 h, em meio básico (pH = 10-11). A reação ocorreu sem ajuste de pH, uma vez que os reagentes possuem caráter básico. Após o término do processamento, as soluções resultantes foram centrifugadas, os sólidos lavados com água deionizada e os produtos secos em estufa a 110 °C por aproximadamente 12 h. O processo de calcinação não foi utilizado.

2.2.2 Sínteses da hidroxiapatita dopada com Ce

A síntese da Ce-HA foi também realizada via MPQ, com o mesmo procedimento adotado para a síntese da hidroxiapatita pura. Porém, com a adição do dopante cério em x mols ($x_{\text{Ce}} = 0,50\%$ m/m) com relação ao cálcio ($\text{Ca}_{10-x}\text{Ce}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Eq. 2) (SINGH et al., 2017). A síntese da HA dopada ocorreu com a adição simultânea, na

solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ sob agitação, a solução de nitrato de cério e de hidróxido de cálcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dissolvido em 50,0 mL de água deionizada. As sínteses ocorreram à temperatura ambiente, sob agitação magnética, durante aproximadamente 3 h em pH básico (pH = 10-11). O processo de calcinação também não foi utilizado.



Após o término do processamento, as soluções resultantes foram centrifugadas, lavadas com água deionizada e os produtos seco também em estufa a 110 °C por 24 h. Os sólidos obtidos foram desaglomerados com o auxílio do almofariz e pistilo e passados em uma peneira de malha 35 VT com abertura de 425 μm . Os pós obtidos foram denominados de HA (hidroxiapatita pura) e Ce-HA (hidroxiapatita contendo 0,50% de cério).

2.3 Caracterizações

2.3.1 Difratomia de Raios X (DRX) e refinamento de Rietveld

Os materiais sintetizados foram caracterizados pela técnica de difração de raios-X (DRX). Foi utilizado o equipamento LABX – XDR 600, Shimadzu, Cu – K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) com 2θ no intervalo de 10° a 60°, com taxa de varredura de 2° min^{-1} e tempo de exposição de 40 minutos. Os tamanhos médios dos cristalitos foram estimados usando a equação Debye–Scherrer (o plano escolhido foi o (002)) (KAYGILI; DOROZHKIN; KESER, 2014). A identificação da composição das fases foi realizada pelo refinamento 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° 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).

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

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier foi realizada em um Espectromêtro 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 HAs e os *scaffolds* 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.

2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplado a 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). A análise elementar por espectroscopia de dispersão de energia (EDS) foi realizada usando uma sonda EDAX Apollo X anexada ao MEV.

2.3.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS)

Os espectros foram obtidos com um sistema de espectrômetro (ESCA+, Scienta-Omicron) equipado com um analisador hemisférico (EA125) e uma fonte de radiação monocromada Al K α (Xm1000, 1486,7 eV). A fonte de raios-X foi usada com uma potência de 280 W, enquanto o espectrômetro trabalhava em um modo de passos de energia constante de 50 eV. As análises foram realizadas no Grupo Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos – Instituto de Física de São Carlos – USP.

2.4 Estudos das propriedades biológicas

2.4.1 Atividade antibacteriana via método do contato direto

O teste de atividade antibacteriana foi realizado via método do contato direto (MCD) utilizando duas cepas de bactérias gram-negativa (*Escherichia coli* - ATCC 25.922) e gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - ATCC 25.923). A partir dos meios de cultura 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% (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 MacFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias - UFC). E em seguida foram realizadas diluições decimais seriadas, em solução salina fisiológica, obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^4$ UFC/mL para ambos os microrganismos.

O teste antimicrobiano foi realizado por contato direto, tendo como resultado a contagem de unidade formadora de colônias (UFC). 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). Em seguida, 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 (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 teste foi realizado em triplicata para cada uma das concentrações testadas. 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 de acordo com a Equação 4:

$$\eta = \frac{N_1 - N_2}{N_1} \times 100\% \quad (4)$$

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.

2.4.2 Viabilidade celular

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* seguiu os procedimentos descritos na ISO 10993-5:2009. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). As células de fibroblastos humanas (GM07492) foram inicialmente semeadas (15×10^3 células/ poço) em placas de 96 poços, as quais, foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e enriquecidas com soro bovino fetal (FBS-10%v/v) e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Foram encubadas em estufa (Panasonic MOC-19-AIC-UV CO2) na temperatura de 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Os materiais foram pesados, esterilizados, imersos em meio de cultura (20 mg/mL) e mantidos a 37 °C durante 24 h para realizar os procedimentos de extração (TAVARES et al., 2011). Após isso, o meio de cultura semeados foi substituído por 100 μ L de meio resultante do procedimento de extração de cada

amostra. Este experimento foi realizado em triplicata e mantido em condições padrão durante 24 h.

Posteriormente, o meio de cultura foi removido dos poços, os quais foram lavados com tampão fosfato salino (PBS). Então, alíquotas de 50 µL de MTT foram adicionadas a cada poço e as células foram mantidas em condições de cultura durante 4 h. 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 percentagens de viabilidade celular em relação a um grupo de controle negativo (DMEM + 10% e FBS = 100% da viabilidade celular). Os efeitos de citotoxicidade foram expressos em termos de porcentagem usando a Equação 5, o grupo controle considerado foi considerado como sendo 100% de viabilidade celular (KIM et al., 2018).

$$DO(\%) = \left(\frac{\text{Absorção das células tratadas}}{\text{Absorção das células controle}} \right) * 100\% \quad (5)$$

Como controle positivo foram usados DMEM + 30% de DMSO e como controle negativo, foram usados DMEM + soro bovino fetal + antibióticos. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Química Medicinal e Medicina Regenerativa da Universidade de Araraquara – UNIARA.

2.5 Análise Estatística

Os dados foram estatisticamente analisados usando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Os grupos foram comparados usando one-way ANOVA e teste post-hoc Fisher. O intervalo de confiança de 95% e nível de significância de $p \leq 0,05$ foram consideradas para todos os testes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização via DRX e refinamento de Rietveld

Para confirmação efetiva da fase e avaliação da cristalinidade do material, o ensaio do DRX foi realizado nas amostras HA e Ce-HA. Os difratogramas dos pós sintetizados pelo MPQ estão disponíveis na Figura 1. Através dos DRXs, percebe-se que os materiais sintetizados possuem boa cristalinidade, sem a presença de fases intermediárias. Utilizando o software *X'Pert HighScoresPlus*, os difratogramas foram comparados aos PDFs da biblioteca do software e comparados juntos ao *Joint Committee on Powder Diffraction and Standards* (JCPDS). As amostras sintetizadas (HA e Ce-HA), tiveram os seus picos indexados ao cartão ICDD 00-001-1008. Os seguintes planos cristalinos foram identificados: (111), (002), (102), (210), (211), (202), (310), (312), (203), (213) e (511); assim como os ângulos de refração $26,06^\circ$; $28,32^\circ$; $32,20^\circ$; $34,35^\circ$; $39,99^\circ$; $46,95^\circ$; $49,80^\circ$ e $53,39^\circ$, respectivamente. Dessa forma, as suas presenças confirmam a existência da fase hidroxiapatita (KURTJAK; VUKOMANOVIĆ; SUVOROV, 2017; VILA et al., 2016).

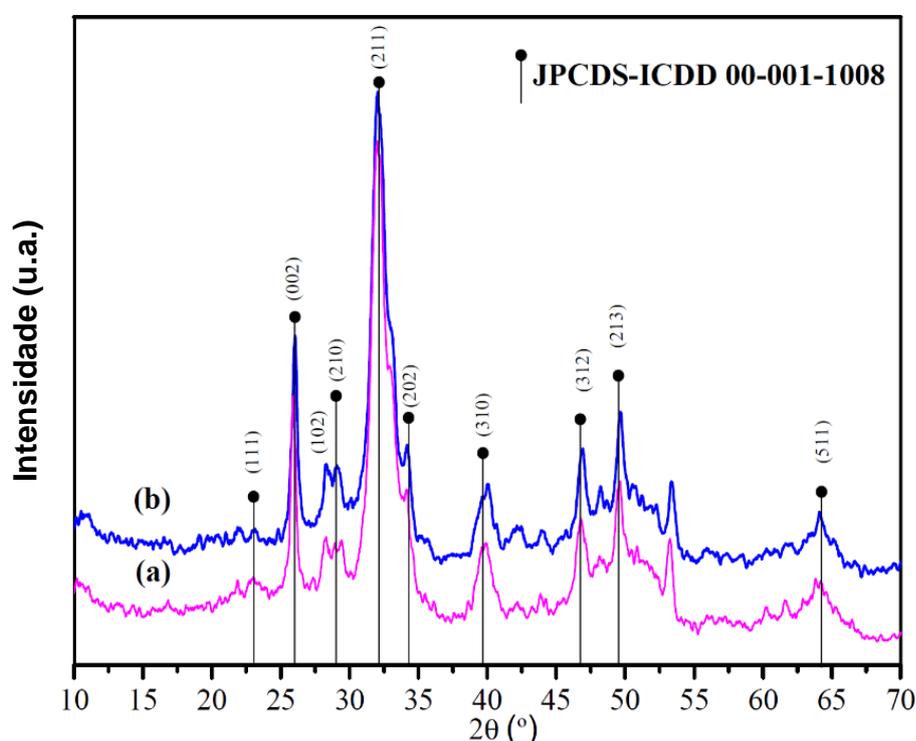


Figura 1. DRX das amostras (a) HA e (b) Ce-HA.

Os valores para o tamanho médio dos cristais calculados pela equação de Debye–Scherrer foram de 25,87 nm, para HA, e 34,51 nm, para a Ce-HA. Os valores

encontrados foram próximos do calculado por de Kaygili et al (2014). Os autores referidos calcularam o tamanho dos cristais utilizando também o plano (002). Acredita-se que essa variação no tamanho dos cristais observada nas hidroxiapatitas sintetizadas nesse estudo pode ser um indicativo prévio atribuído à presença do íon cério (Kaygili et al., 2014).

Através do refinamento de Rietveld é possível se ter uma estimativa da aproximação dos difratogramas do modelo estrutural em comparação com arquivos CIF disponibilizado em bancos de dados de cristalografia. As Figuras 2a e 2b mostram um bom acordo entre os padrões de DRX observados e os resultados de ajuste teórico calculados para a HA e Ce-HA. Na Figura 2c tem-se a representação da célula unitária de estrutura da hidroxiapatita simulada pelo programa VESTA (*Visualization for Electronic and Structural Analysis*) (MOMMA; IZUMI, 2011), versão 3.4.4 para Windows, com base nos parâmetros de rede (a , b , c , α , β e γ) e posições atômicas (x , y e z) obtidos após o refinamento.

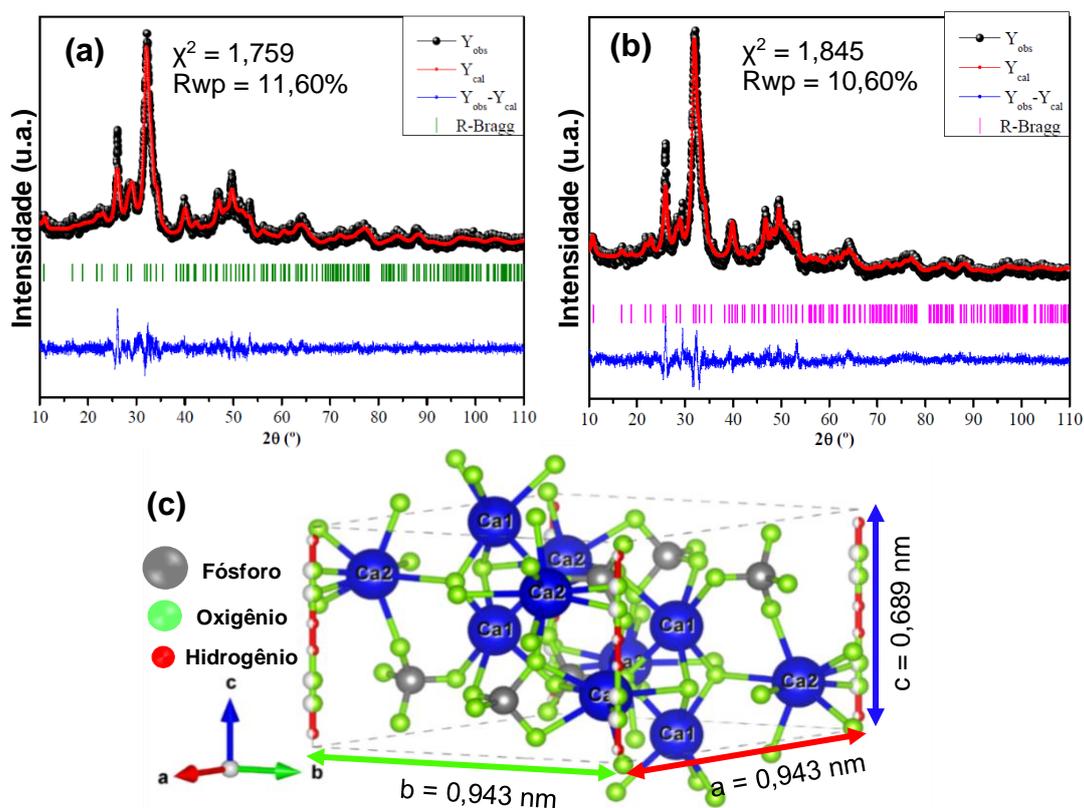


Figura 2. Refinamento de Rietveld para o pó de (a) HA e (b) Ce-HA obtidos pelo MPQ. (c) Representação das células unitárias das hidroxiapatitas obtidas nesse estudo.

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 Ce-HA. Normalmente, um refinamento é qualificado como satisfatório quando o valor de χ^2 ou χ^2 (fator de convergência) é menor que dois ($\chi^2 < 2$) (VIEIRA et al., 2013).

Para esse refinamento o valor de χ^2 foi igual a 1,845 para a amostra de HA e 1,759 para amostra Ce-HA, indicando que o refinamento foi bem-sucedido. Para que os resultados obtidos com o refinamento sejam considerados aceitáveis, o Rwp deve possuir valores próximos a 8% para estruturas cúbicas (simetria elevada com poucos picos de difração). Para estruturas tetragonal, ortorrômbica, romboédrica ou hexagonal (fase média complexa) os valores de Rwp devem ser próximos a 8-10 e, por fim, para estrutura monoclinica ou triclinica (alta fase complexa) esses valores encontra-se entre 10 e 15% (CAVALCANTE et al., 2012).

Os valores de Rwp para as amostras de HA e Ce-HA foram, 10,60% e 11,06%, respectivamente. Os parâmetros de rede da célula unitárias gerados após o refinamento, para o Ce-HA, estão dispostos na Tabela 1. Alguns desses parâmetros são comparados com outros valores reportados na literatura.

Tabela 1. Parâmetros de rede obtidos após refinamento de Rietveld para as células unitárias da Ce-HA.

HA	Parâmetros de célula							Ref.
	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V (Å ³)	
Ce-HA	9,422	9,422	6,875	90	90	120	528,55	♦
HA	9,424	9,424	6,879	90	90	120	529,09	ICSD
HA	9,406	9,406	6,879	90	90	120	527,10	KEBIROGLU et al., 2017
HA	9,418	9,418	6,884	90	90	120	-	YAO et al., 2003
HA	9,418	9,418	6,884	90	90	120	-	MANOJ et al., 2015
Ce-HA	9,413	9,413	6,873	90	90	120	576,78	CIOBANU et al., 2015
Sr-HA	9,767	9,767	7,267	90	90	120	548,08	LEI et al., 2017

♦ = resultado obtido pelos autores desse estudo

Após o refinamento, foi observado as seguintes porcentagens de fase para a Ce-HA: 96,98% referentes a fase da hidroxiapatita e 3,02%; corresponde a fase do cério (ISCD 43381) ($a = b = 4,250 \text{ \AA}$, $c = 5,842 \text{ \AA}$ e $V = 91,37 \text{ \AA}^3$), com grupo espacial P63/mmc. Embora a quantidade de íon adicionado não tenha sido suficiente para causar o surgimento de novos picos de difração, uma variação, nos parâmetros de rede e no volume da célula unitária (Tabela 1), ainda que discreto, sugerem que houve alteração da rede cristalina, confirmando os resultados do DRX. Acredita-se que a fase sobressalente de cério, não identificada pelo refinamento, permanece decorando a superfície da hidroxiapatita.

A célula unitária é formada por 10 íons de cálcio situados em dois sítios distintos (Ca1 e Ca2) (Figura 3c). Os átomos de cálcio Ca1, estão localizados nas extremidades de um sextavado da célula unitária, enquanto que os átomos Ca2 formam triângulos equilátero paralelos ao eixo c. Existem também 4 sítios distintos de oxigênio (O1, O2, O3 e O4). O O4 está ligado ao H1 para formar a hidroxila e os sítios de P1 são todos equivalentes, do tipo PO₄, estão ligados ao O1, O2 e O3, são os maiores íons que constroem células unitárias, sendo o único a determinar a sua estrutura (LALA et al., 2016).

3.2 Identificação do Ce e cálculo da razão Ca/P

Para corroborar com os resultados teóricos gerados pelo refinamento de Rietveld, a identificação do cério na estrutura da hidroxiapatita foi dada pelas técnicas de FTIR, EDS e XPS. Os espectros de FTIR da amostra HA e Ce-HA estão dispostos na Figura 3. O espectro da HA e Ce-HA (Figuras 3a e 3b), mostra a banda na região de 3578 cm^{-1} , refere-se ao estiramento O-H da hidroxila característica de fases hidroxiapatita. Já bandas em 3441 cm^{-1} e 1644 cm^{-1} , correspondem a deformações e estiramentos O-H de água adsorvida na superfície do material. As bandas em 1104 cm^{-1} , 1033 cm^{-1} e 961 cm^{-1} , corresponde a vibração de estiramento assimétrico e simétrico, relacionados a grupos PO₄³⁻ em HPO₄²⁻. A banda em torno de 601 cm^{-1} é referente a deformação assimétrica tipo P-O do grupo PO₄³⁻. Na região de 566 cm^{-1} tem-se a deformação do tipo P-OH e em 458 cm^{-1} , são mostradas bandas correspondentes as vibrações de deformações assimétricas do grupamento HPO₄²⁻ (P-O-(H)) (MALAKAUSKAITE-PETRULEVICIENE et al., 2016).

As bandas em destaque na região de 1989 cm^{-1} , 1422 cm^{-1} e 875 cm^{-1} , assemelham-se às vibrações de estiramento e deformações de algumas substituições

de carbonato, indicando que houve formação de carbonato de cálcio no meio reacional. O carbonato seria originado a partir do CO_2 presente no ambiente da síntese ($\text{CO}_2 + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$) realizada ao ar livre, juntamente com pH básico (pH = 10-11) do meio. Autores destacam que a presença de carbonato na fase não é um problema (ANWAR; AKBAR, 2018; LEEUWENBURGH et al., 2006).

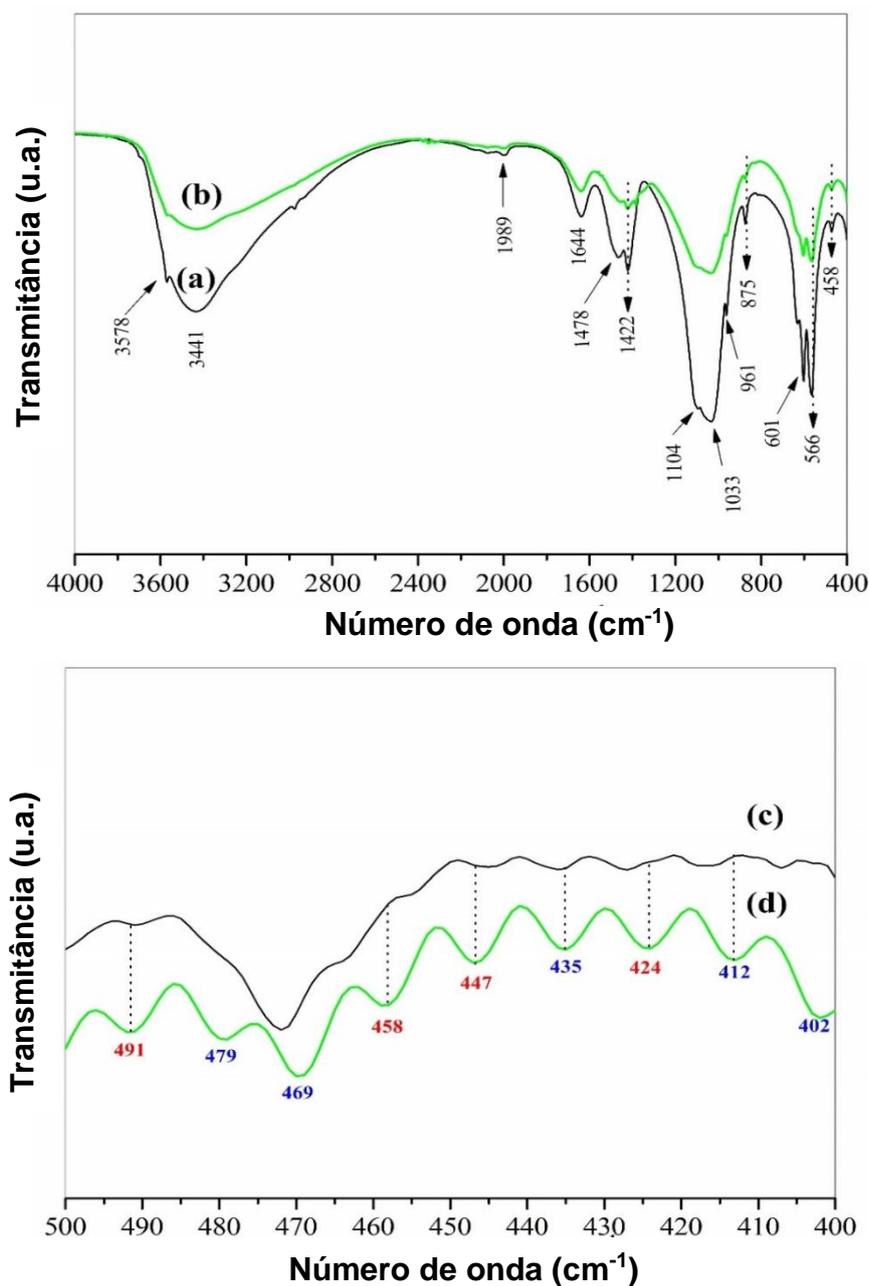


Figura 3. Espectros FTIR para (a) HA e (b) Ce-HA e sua ampliação que encontram-se entre a região 500-400 cm^{-1} correspondendo a (c) HA e (d) Ce-HA.

Na literatura, os modos vibracionais da ligação Ce-O encontram-se na faixa do infravermelho entre 800-400 cm^{-1} , na Figura 3d, as bandas 491, 458, 447 e 424 cm^{-1}

são atribuídas a vibrações relacionadas as ligações do tipo Ce-O (HARISH et al., 2018; HASSANNEJAD et al., 2017; SENTHILKUMAR et al., 2017).

Os espectros provenientes do EDS e XPS para os pós HA e Ce-HA estão dispostos na Figura 4. Por meio do EDS, os constituintes elementares da hidroxiapatita (Ca, P e O) (Figura 4a), assim como o dopante Ce (Figura 4b), foram identificados. Por meio da técnica de XPS foi possível detectar os principais picos característicos para esses componentes, são eles: 529,3 eV (O_{1s}), 439,7 eV (Ca_{2s}), 347,5 eV (Ca_{2p}), 187,7 eV (P_{2s}) e 131,8 eV (P_{2p}) (Figuras 4c e 4d).

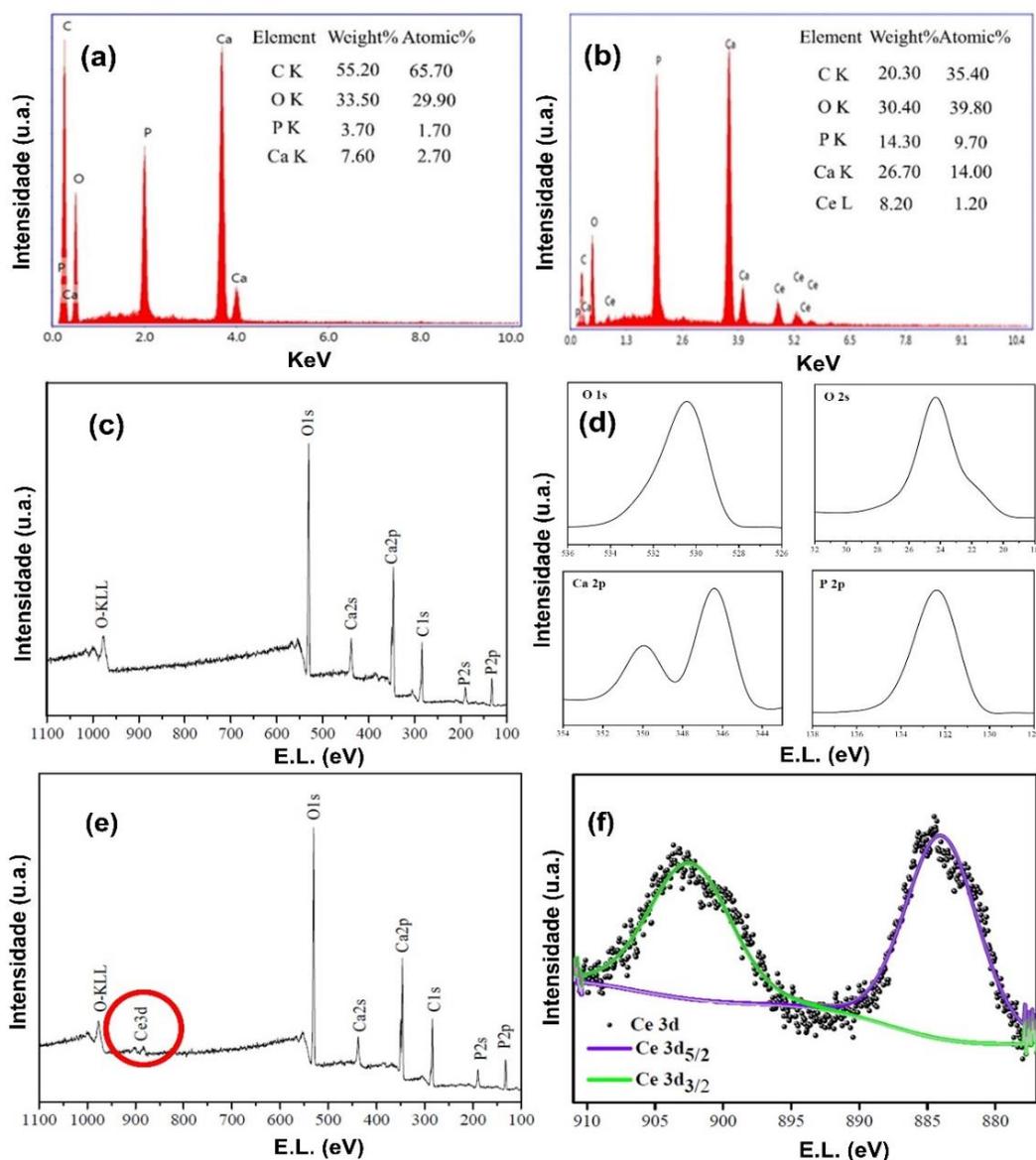
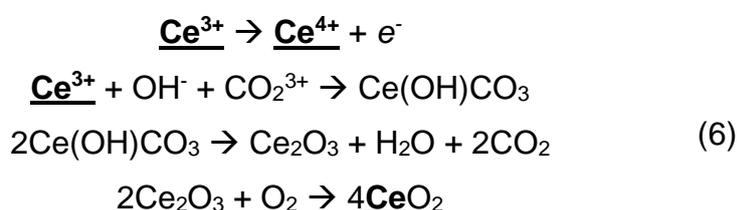


Figura 4. (a) Espectro de EDS para a HA, (b) espectro de EDS para a Ce-HA, (c) espectro de XPS para a HA, (d) linhas de emissão relativas ao O, Ca e P que compõem a hidroxiapatita, (e) espectro de XPS para a Ce-HA e (f) linhas de emissão relativas ao dublete de elétrons ejetados dos orbitais 3d do Ce.

Na Figura 4e é possível observar as linhas de emissão relativas ao dublete de elétrons ejetados de orbitais 3d do Ce na região entre 880-905 eV. A deconvolução (*peak-fitting*) (Figura 4f) da área em destaque em vermelho na Figura 4e, revelou nove tipos de excitação na energia de ligação para os dubletes 3d_{5/2} e 3d_{3/2}. São quatro para 3d_{5/2} (881,2; 882,3, 883,8 e 885,3 eV) e cinco para 3d_{3/2} (897,3; 899,4; 900,4; 902,2 e 904,2 eV). As energias de ligações (E.L.) identificadas no XPS revelaram a presença do íon cério em dois estados de oxidação (Ce³⁺ e Ce⁴⁺).

As propriedades termodinâmicas do cério, através do diagrama de Pourbaix, revela que os íons cérios são solúveis em ácidos fortes, enquanto os seus complexos hidroxílicos são insolúveis e bastantes estáveis em pH neutros e básicos (POURBAIX, 1966). Além disso, os íons cério exibem uma complicada química de solubilidade devido a sua alta suscetibilidade à complexação, resultante da influência do elétron no orbital 4f.

Isso é uma característica importante dos lantanídeos que são conhecidos por formarem complexos hidratados em solução. Esses complexos são favorecidos devido a reações químicas entre ligantes aniônicos de alta eletronegatividade, como é o caso do OH⁻ presente em excesso no meio reacional (ARENAS; PONCE DE LEÓN; WALSH, 2016). Assim, em pH entre 10-11, pelo diagrama de Pourbaix, as espécies químicas Ce(OH)₃ e CeO₂ são formadas. O nitrato de cério utilizado para a síntese da Ce-HA nesse estudo foi o Ce(NO₃)₃. Acredita-se que a oxidação da espécie dopante (Ce³⁺) (Equação 6) tenha se dado devido a síntese ter ocorrido em sistema aberto e em meio básico (CHEN et al., 2014).



As linhas de emissão de alta intensidade relativas ao dublete de elétrons ejetados de orbitais d do Ce (IV) apresentaram percentual de área de 43,53%; enquanto para o Ce (III), o percentual de área foi de 56,47%. Os respectivos valores E.L. estão melhores organizados na Tabela 2.

Tabela 2. Posições dos picos de XPS para os pós HA e Ce-HA sintetizados nesse estudo.

Amostras	Posição dos picos (E.L., eV)							
	O _{1s}	Ca _{2s}	Ca _{2p1/2}	Ca _{2p3/2}	P _{2s}	P _{2p}	O _{2s}	Ce _{3d}
HA	529,3	438,0	349,7	346,4	189,9	132,3	24,0	-
Ce-HA	530,4	438,2	349,8	346,3	189,6	132,3	24,2	904,0-884,6

E.L: Energia de ligação

Já a Tabela 3 traz a E.L. para os componentes elementares da hidroxiapatita, assim como um acoplamento spin-orbita que identifica e revela a presença de duas espécies químicas de Ce (III e IV) no material Ce-HA. Esse acoplamento foi identificado após deconvolução espectral.

Tabela 3. Acoplamento spin-orbita de acordo a energia de ligação para as espécies de cério identificadas pelo XPS.

Tipo de Ce	Posição dos picos	E.L (eV)	Acoplamento spin-orbita	%Área
(III)	v1	884,5	3d _{5/2}	20,55
(III)	v1'	885,8	3d _{5/2}	2,20
(III)	v1''	886,9	3d _{5/2}	9,09
(III)	u1	899,8	3d _{3/2}	4,73
(III)	u1'	904,2	3d _{3/2}	19,90
(IV)	v	881,8	3d _{5/2}	23,05
(IV)	v'	897,3	3d _{5/2}	4,40
(IV)	u	900,4	3d _{3/2}	2,80
(IV)	u'	902,2	3d _{3/2}	13,28

E.L: Energia de ligação

A distância entre os picos relativos ($\Delta = u - v$) dos orbitais degenerados 3d do Ce são: $\Delta = 18,46$ para o Ce(IV) e $\Delta' = 18,48$ para o Ce(III). Esses valores são semelhantes aos encontrados por Murugan et al.. As energias de ligação nas posições v, v', u e u' são atribuídas ao cério tetravalente, e as posições v1, v1', v1'', u1 e u1' são atribuídos ao cério trivalente (BÊCHE et al., 2008; MURUGAN; VIJAYAPRASATH; RAVI, 2015; PAPAARAZZO, 2017; UHART et al., 2016). O estado eletrônico atribuído a posição v e u, no acoplamento spin-orbita 3d_{5/2} e 3d_{3/2} são Ce(IV)3d⁹4f²O2p⁴ e

$Ce(III)3d^94f^1O2p^6$. Já para as posições v' e u' , os estados eletrônicos são $Ce(IV)3d^94f^1O2p^5$ e $Ce(III)3d^94f^2O2p^5$ (UHART et al., 2016).

Também através dos dados gerados pelas técnicas de EDS e XPS, foi possível calcular a razão Ca/P semi-quantitativa e quantitativa. Os valores da razão Ca/P calculados, mostram que a razão para HA (Ca/P) e Ce-HA ((Ca+Ce)/P) foram de 1,51 a 1,56 (razão semi-quantitativa) via detecção por EDS; e 1,44 a 1,50 (razão quantitativa) via detecção por XPS. A Figura 5 mostra o espectro com os respectivos valores de quantificação dos componentes elementares da amostra Ce-HA. A quantificação foi realizada utilizando o software CasaXPS versão 2.3.19PR1.0. Os valores da razão semi-quantitativa são comparados com outros valores calculados e encontrados na literatura (Tabela 4) e a porcentagem molar quantitativa (*%molar*) dos componentes elementares da amostra Ce-HA encontra-se melhor dispostos também na Tabela 5. Os valores da *%molar* foram obtidos pela conversão dos valores da porcentagem atômica (*%atômica*) por meio do número de Avogadro.

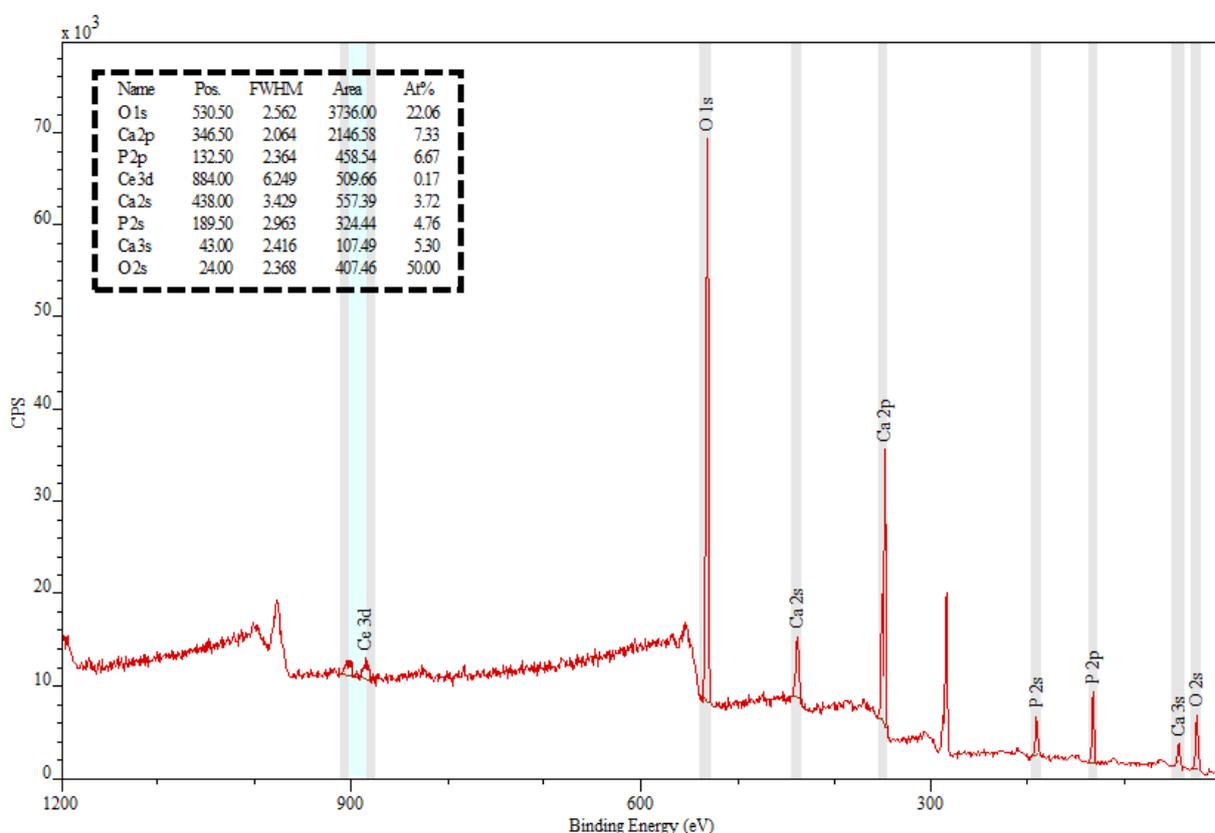


Figura 5. Porcentagem atômica dos componentes elementares que constituem a amostra Ce-HA. A quantificação foi realizada utilizando o software CasaXPS.

Os valores obtidos das razões Ca/P para as amostras neste trabalho, revelaram que a hidroxiapatita sintetizada é do tipo deficiente em cálcio (CDHA ou Ca-def HA). As hidroxiapatitas do tipo Ca-def HA ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, onde $0 < x < 1$), são caracterizadas por possuírem razões Ca/P variando entre 1,50 a 1,67 (DOROZHKIN, 2010; FAROKHI et al., 2018). De acordo com Lowry et al. 2018, essa razão Ca/P é esperada e seria consequência da substituição do íon dopante na rede de hidroxiapatita (LOWRY et al., 2018). Os valores de “x” são correspondente a quantificação elementar do cálcio obtido via caracterização por XPS (Tabela 3); portanto, o valor de $x \cong 0,24$ para a HA e $x \cong 0,16$ para a Ce-HA. Por fim, a %atômica calculado para o Ce foi de cerca de 0,17%. Dessa forma, a fórmula química teórica para as amostras de HA (Ca-def HA) e Ce-HA (Ca-def Ce-HA) para esse trabalho foram $\text{Ca}_{9,76}(\text{HPO}_4)_{0,24}(\text{PO}_4)_{5,76}(\text{OH})_{1,76}$ e $\text{Ca}_{9,84}\text{Ce}_{0,017}(\text{HPO}_4)_{0,16}(\text{PO}_4)_{5,84}(\text{OH})_{1,84}$, respectivamente.

Tabela 4. Razão semi-quantitativa da HA e Ce-HA obtida por EDS em comparação com razões Ca/P disponíveis na literatura.

Hidroxiapatita	Ca/P	(Ca+dop)/P	Ref.
HA	1,56	-	♦
Ce-HA	-	1,51	♦
Ca-def HA	-	1,46	REN et al., 2015
Ce-HA	-	1,55	KANCHANA; et al., 2017
HA	1,56	-	YANG et al., 2017
Zn-HA	-	1,34	YANG et al., 2017
Bi-HA	-	1,67	AL-HAZMI, 2016

dop: dopante e **♦:** resultado obtido pelos autores nesse estudo

Tabela 5. Razão Ca/P calculada via XPS para os pós de HA e Ce-HA sintetizados.

Amostra	%molar (10^{-23} mols)				Razão	
	O	Ca	P	Ce	Ca/P	(Ca+Ce)/P
HA	10,010	3,950	2,630	-	1,50	-
Ce-HA	11,960	2,710	1,900	0,029	1,43	1,44

A metodologia de síntese, nesse estudo, mostrou-se simples e eficiente, mesmo não utilizando altas temperaturas. Por exemplo, Cioubanu et al., sintetizaram hidroxiapatita dopada com cério (IV), em diferentes concentrações (0 a 0,25% m/m), via método da co-precipitação, para aplicações antibacterianas (Cioubanu et al., 2015). Os valores encontrados para a razão (Ca+Ce)/P variam entre 1,671 a 1,673. O tempo de envelhecimento utilizado na síntese foi de 3 h a 60 °C, seguido de calcinação com taxa de aquecimento de 800 °C por 1 h. Lei et al., sintetizaram um biocompósito SrHA/QT, também utilizado para fins em aplicações na área da engenharia tecidual óssea. Os autores obtiveram a fase da hidroxiapatita por pré-aquecimento (90 °C) e com tempo de envelhecimento de 12 h. Após lavagem e secagem, a obtenção dos pós foi feita a 900 °C durante 4 h (Lei et al., 2016).

A hidroxiapatita de razão Ca/P = 1,67 é bastante utilizada em cirurgias ortopédicas e maxilofaciais para reparar defeitos ósseos, pois apresenta excelente resposta tecidual e osteocondutividade (JAZAYERI et al., 2017; SOBCZAK-KUPIEC et al., 2018). No entanto, esse tipo de material é muito estável no corpo e leva muito tempo para ser reabsorvido devido à sua alta cristalinidade (BOHNER; GALEA; DOEBELIN, 2012). Em contraste, a Ca-def HA possui propriedades mais próximas a do osso humano em relação ao teor de cálcio e cristalinidade, além de possuir uma maior taxa de dissolução em fluidos corporais fisiológicos. Vale ressaltar também, que os tecidos naturais ósseos são compostos por HA deficiente em cálcio (ANWAR; AKBAR, 2018; YINGGUANG; ZHUORU; JIANG, 2007; ZHANG et al., 2010). Assim, a Ca-def HA obtida nesse estudo assume propriedades bastantes promissoras para ter seu uso voltado as aplicações médicas na área da engenharia tecidual óssea.

A diminuição no volume da célula unitária da fase hexagonal, observado após o refinamento (Tabela 1), com a presença dos dopantes, ao se comparar com o cartão nº 26205 (de 529,09 Å³ para 528,55 Å³), tem-se um forte um indicativo da possível substituição de Ce³⁺ e Ce⁴⁺ na rede da HA. O íon Ce³⁺ (raio iônico = 0,107 nm), por ser maior do que o íon Ca²⁺ (raio iônico = 0,100 nm) (YINGGUANG; ZHUORU; JIANG, 2007) pode substituir o cálcio do sítio Ca(1). Enquanto o sítio Ca(2) é ocupado pelos íons Ce⁴⁺ (raio iônico = 0,097 nm) (Figura 2c), por possuir menor raio iônicos (CIOBANU; BARGAN; LUCA, 2015), quando comparado ao raio iônico do Ca²⁺. A eletronegatividade do cério (1,06) (valores próximos aos de Ca = 1,01) pode ser outra

propriedade que favoreça a substituir do cálcio por cério na rede da hidroxiapatita (YINGGUANG; ZHUORU; JIANG, 2007).

Esta alta afinidade e semelhança nas suas propriedades periódicas, sugerem que o cério substitui o cálcio e dessa forma, poderá vir a intervir no processo de remodelação óssea. Por exemplo, os resultados obtidos por Hu, et al., sugerem que o cério promove a migração e diferenciação osteogênica das células estromais de medula óssea (Hu, et al (2014)). A metodologia usada neste trabalho, para a síntese da HA e da Ce-HA, mostrou-se eficiente. Uma vez que a boa convergência obtida pelo refinamento e as respostas geradas pelas técnicas espectroscopias utilizadas nesse estudo (FTIR, EDS e XPS) confirmaram a fase e a presença dos íons dopantes (Ce^{4+} e Ce^{3+}) substituindo o Ca^{2+} no retículo cristalino da hidroxiapatita.

3.3 Efeito inibitório contra cepas bacterias

Os efeitos inibitórios contra bactérias gram-negativas e gram-positivas foi investigada para comprovar as melhorias dessa propriedade ao material com a inclusão dos íons Ce^{3+} e Ce^{4+} na HA. O estudo das propriedades antibacteriana das HA e Ce-HA foram avaliadas contra as cepas *E. coli* (ATCC 25,922) e *S. aureus* (ATCC 25,923). A Figura 6 mostram os resultados dos efeitos inibitórios antibacterianos na forma gráfica e traz as fotos das placas obtidas após ensaio de inibição bacteriana via MCD. Os resultados foram calculados e são expressos de acordo com a Equação 4.

As partículas de HA apresentaram um efeito inibitório de cerca de $7,0 \pm 3,0\%$ para *E. coli* e $3,0 \pm 2,0\%$ para *S. aureus*. Com o material contendo o Ce, o efeito inibitório passou a ser de $\sim 49 \pm 6\%$ e $46 \pm 4\%$, para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Em termos estatísticos, os materiais HA e Ce-HA apresentaram a mesma eficiência proporcional inibitória para ambas as cepas gram-negativas e gram-positivas. Para as partículas de Ce-HA, uma potencialização de cerca 40%, ao se comparar com os resultados obtidos para a HA, foi observada.

Os resultados encontrados por Ciobanu e colaboradores, mostraram que a substituição da hidroxiapatita por cério nas proporções de 10% e 20%, contra *E. coli* e *S. aureus*, via método disco-difusão, foram de 31,38% e 53,33% para a *E. coli*, e 29,01% e 34,03%, para inibição da e *S. aureus*. Os resultados apresentados na Figura 7 que o efeito inibitório apresentada pelas partículas contendo 0,05% de cério

obtiveram perfis de inibição similares aos relatados no estudo citado (CIOBANU; BARGAN; LUCA, 2015).

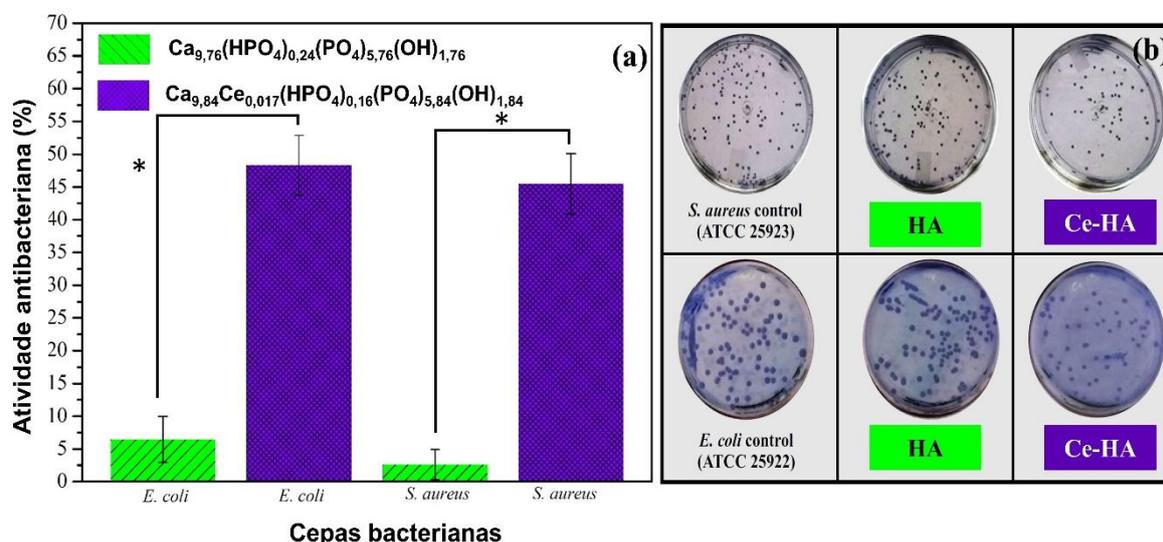


Figura 6. (a) Efeito inibitório contra as cepas *E. coli* (ATCC 25992) e *S. aureus* (ATCC 25923) e (b) imagens das placas do ensaio antibacteriano via MCD das partículas de hidroxiapatita sintetizadas.

Os efeitos de atividades antibacterianas de metais de transição pode está relacionado a uma natureza de uma indução eletrostática entre as partículas e membrana celular das bactérias (KHADAR et al., 2019); assim, acredita-se que os íons cérios (TRAMPUZ; ZIMMERLI, 2006) presentes na estrutura da hidroxiapatita podem interagir com a membrana celular, podendo levar a danos estruturais e morte das células (FENG; LIAO; YE, 2005). Além disso, a diminuição da cristalinidade da hidroxiapatita substituída ou dopada pode levar ao aumento da sua solubilidade e a diminuição da cristalinidade do material; logo, existindo uma maior probabilidade do aumento da interação entre o material e a parede celular das bactérias (CIOBANU; HARJA, 2019).

A maior atividade inibitória antibacteriana contra cepas bacterianas gram-negativas (*E. coli*) revela que a existência dos íons cério na estrutura de hidroxiapatita pode levar a cargas superficiais positivas para as partículas Ce-HA, o que pode proporcionar uma indução por atração eletrostática entre as bactérias e o material (CIOBANU; HARJA, 2019; PRIYADARSHINI; ANJANEYULU; VIJAYALAKSHMI, 2017). Já os resultados para a *S. aureus* são bastantes relevantes, uma vez que as infecções nos implantes são geralmente causadas por estas bactérias (BABENKO et al., 2012; OUYANG et al., 2009). Uma pesquisa descrita por Trampuz e Zimmerli,

demonstrou que cerca de 30% dos casos de infecções relacionadas ao implante foram causados por *S. aureus*. Essa bactéria é considerada como a principal responsável por infecções em regiões osteoarticulares. Logo, os resultados potencializados com a presença do Ce é bastante relevante contra o crescimento da *S. aureus* (TRAMPUZ; ZIMMERLI, 2006).

3.4 Efeito da viabilidade celular

A Figura 7 mostra os resultados do teste de citotoxicidade via ensaio calorimétrico MTT. O ensaio ocorreu com os materiais precursores HA e Ce-HA. O teste foi executado via extrato dos materiais com tempo de incubação de 24 h. Os resultados do metabolismo celular foram comparados com o controle negativo (DMEM + FBS 10% v/v) (100% de proliferação) e os grupos foram classificados como sendo (GUO et al., 2012): resultados acima de 80% são considerados não citotóxicos; aqueles entre 80 e 71%, fracamente citotóxicos; aqueles entre 70 e 61%, moderadamente citotóxico; e aqueles abaixo de 60%, fortemente. A Figura 7 mostra os resultados obtidos que foram expressos em densidade ótica (OD)×100 (Equação 5), obtidas por um espectrofotômetro em 570 nm.

Os resultados de viabilidade celular avaliados apontaram que os materiais HA e Ce-HA tiveram níveis de viabilidade compatíveis com um efeito não citotóxico (viabilidade celular $\geq 80\%$). A análise estatística mostrou que os materiais cerâmicos HA e Ce-HA apresentaram níveis de viabilidade celular de $89,0\pm 1,0\%$ e $99,0\pm 3,0\%$, respectivamente, assim, uma similar ao grupo controle negativo (100%), com significativamente de $p \leq 0,05$, foi observado.

Priyadarshini e Vijayalakshmi (2018), estudaram a viabilidade células de osteoblastos durante 24 e 48h em diferentes concentrações (20 a 100 mg/mL) do pó Ce/Si-HAP@5,0%. Após período de incubação celular, foram observadas, para o tempo de 24 h, os seguintes percentuais de proliferação celular: 102% (20 mg/mL), 105% (40 mg/mL), 108% (60 mg/mL), 110% (80 mg/mL) e 91% (100 mg/mL) (PRIYADARSHINI; VIJAYALAKSHMI, 2018). As partículas de HA e Ce-HA sintetizadas também não interferiram na atividade metabólica celular e, conseqüentemente, na viabilidade celular. Logo, os materiais HA e Ce-HA foram classificados como não citotóxicos (inibição menor do que 20% em relação ao grupo controle).

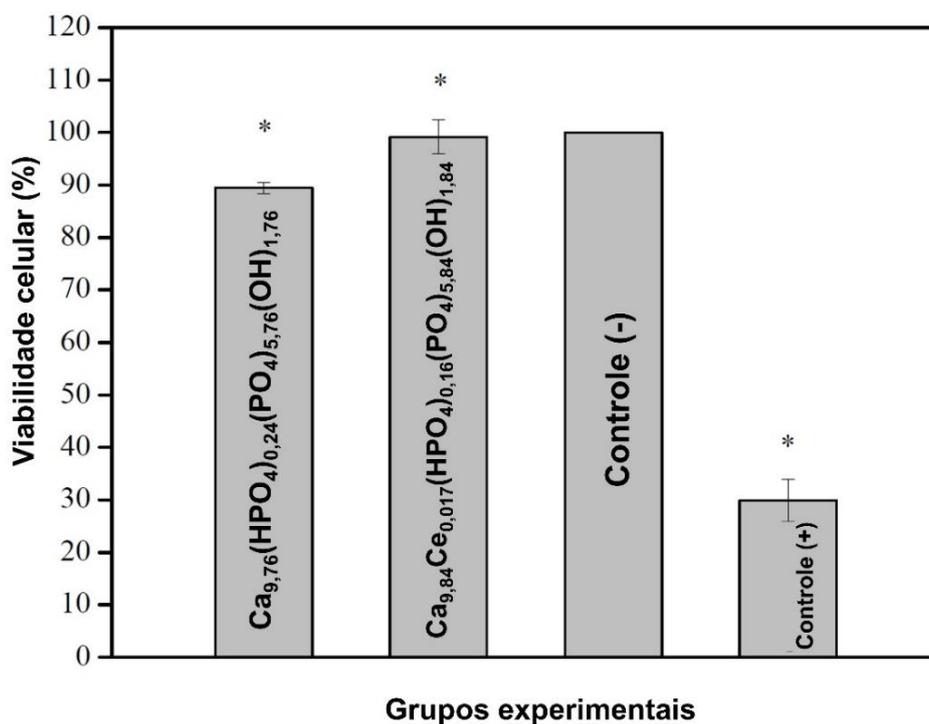


Figura 7. Resultados da viabilidade celular *in vitro* dos materiais sintetizados nesse estudo. Os resultados são expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle negativo (C-): DMEM + FBS a 10% v/v. O grupo controle positivo (C+) como referência de efeito citotóxico é composto por: DMEM + FBS 10% v/v + DMSO 30% v/v. Análise estatística: ANOVA ONE WAY e o teste post-hoc. * $p \leq 0,05$.

O material Ce-HA exibiu um efeito de proliferação celular, em comparação a HA-pura, de cerca de 10% a mais. Acredita-se que essa potencialização dos efeitos de indução do crescimento celular ao se comparar com os efeitos de viabilidade também positivos do material HA, é devida ao fato da presença do cério na Ce-HA. Atkinson e colaboradores descartaram que a presença do cério nos materiais proporciona algumas propriedades biológicas, tais quais, bioatividade, atividade osteogênica e atividade antimicrobiana (ATKINSON et al., 2019); além disso, o cério apresenta efeitos positivos na proliferação celular *in vitro* em osteoblastos (ZHANG et al., 2010) e atua como agente neuroprotetor (SCHUBERT et al., 2006).

4. CONCLUSÃO

O estudo da incorporação do íon cério por meio da dopagem, na estrutura da hidroxiapatita, mostrou-se favorável à junção a potencialização das propriedades antibacterianas e antimicrobianas a cerâmica Ce-HA. A síntese da hidroxiapatita (HA) e da hidroxiapatita dopada com cério (Ce-HA), realizada pelo MPQ mostrou-se eficiente. Os DRXs tiveram seus picos indexados ao cartão nº ICDD 00-001-1008, confirmando que os materiais são cristalinos. A presença de fases intermediárias não foi detectada. Os parâmetros de rede fornecidos pelo método de Rietveld confirmaram que a estrutura é hexagonal e possui grupo espacial P63/m. As caracterizações por FTIR, EDS e XPS confirmaram a presença da fase hidroxiapatita e do cério em duas formas oxidadas (Ce^{3+} e Ce^{4+}). A razão quantitativa e semi-quantitativa Ca/P calculada variou entre 1,44 e 1,56; revelando que o material é do tipo Ca-def HA. Os testes antimicrobianos por contato direto contra *S. aureus* e *E. coli* mostraram eficácia de inibição média de cerca de 40% quando comparada ao material HA. Os resultados da viabilidade *in vitro* que a presença do cério, potencializou o grau de biocompatibilidade do material Ce-HA. A proliferação celular variou entre 89 a 99%, possibilitando, então, classificar as partículas de hidroxiapatita, após 24 h de tempo de incubação celular, como sendo não citotóxicos. Portanto, desenvolveu-se uma biocerâmica com potencial de ser utilizado como biomaterial de preenchimento de pequenas partes da arcada dentárias, maxilar ou para outras aplicações na área da engenharia tecidual óssea.

5. REFERÊNCIAS

- AL-HAZMI, F. E. Synthesis and electrical properties of Bi doped hydroxyapatite ceramics. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 665, p. 119–123, 2016.
- ANWAR, A.; AKBAR, S. Continuous microwave assisted flow synthesis and characterization of calcium deficient hydroxyapatite nanorods. **Advanced Powder Technology**, v. 29, n. 6, p. 1493–1498, 2018.
- ARENAS, L. F.; PONCE DE LEÓN, C.; WALSH, F. C. Electrochemical redox processes involving soluble cerium species. **Electrochimica Acta**, v. 205, p. 226–247, 2016.
- ATKINSON, I. et al. Cerium-containing mesoporous bioactive glasses: Material characterization, *in vitro* bioactivity, biocompatibility and cytotoxicity evaluation. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 276, n. July 2018, p. 76–88, 2019.
- BABENKO, L. P. et al. Antibacterial activity of cerium colloids against opportunistic

microorganisms in vitro. **Mikrobiolohichnyĭ zhurnal (Kiev, Ukraine : 1993)**, v. 74, n. 3, p. 54–62, 2012.

BÊCHE, E. et al. Ce 3d XPS investigation of cerium oxides and mixed cerium oxide (Ce_xTi_yO_z). **Surface and Interface Analysis**, v. 40, n. 3–4, p. 264–267, 2008.

BOHNER, M.; GALEA, L.; DOEBELIN, N. Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 32, n. 11, p. 2663–2671, 2012.

CAVALCANTE, L. S. et al. Electronic structure, growth mechanism and photoluminescence of CaWO₄ crystals. **CrystEngComm**, v. 14, n. 3, p. 853–868, 2012.

CHEN, Y. et al. Facile synthesis of ceria nanospheres by Ce(OH)CO₃ precursors. **Materials Letters**, v. 122, p. 90–93, 2014.

CIOBANU, G.; BARGAN, A. M.; LUCA, C. New cerium(IV)-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Preparation and characterization. **Ceramics International**, v. 41, n. 9, p. 12192–12201, 2015.

CIOBANU, G.; HARJA, M. Cerium-doped hydroxyapatite/collagen coatings on titanium for bone implants. **Ceramics International**, v. 45, n. 2, p. 2852–2857, 2019.
CURREY, J. D. Hierarchies in biomineral structures. **Science**, v. 309, n. 5732, p. 253–254, 2005.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 4, p. 1061–1095, 2007.

DOROZHKIN, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1465–1485, 2010.

FAROKHI, M. et al. Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 68–91, 2018.

FENG, Z.; LIAO, Y.; YE, M. Synthesis and structure of cerium-substituted hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 5, p. 417–421, 2005.

FRASNELLI, M. et al. Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 653–662, 2017.

GOMES, D. S. et al. A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine. **Cerâmica**, v. 65, n. 374, p. 282–302, 2019.

GRADO, G. F. DE et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. **Journal of Tissue Engineering**, v. 9, p. 1–18, 2018.

GUO, B. et al. Electroactive porous tubular scaffolds with degradability and non-cytotoxicity for neural tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 144–153, 2012.

HARISH, B. M. et al. Influence of zinc on the structural and electrical properties of cerium oxide nanoparticles. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 1, p. 3070–3077, 2018.

HASSANNEJAD, H. et al. Microstructure, deposition mechanism and corrosion behavior of nanostructured cerium oxide conversion coating modified with chitosan on AA2024 aluminum alloy. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 725, p. 968–975, 2017.

HU, Y. et al. Cerium promotes bone marrow stromal cells migration and osteogenic differentiation via Smad1/5/8 signaling pathway. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 8, p. 5369–5378, 2014.

HUANG, Z. et al. Incorporation of strontium into hydroxyapatite via biomineralization of collagen fibrils. **Ceramics International**, v. 41, n. 7, p. 8773–8778, 2015.

JAZAYERI, H. E. et al. A current overview of materials and strategies for potential use in maxillofacial tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, p. 913–929, 2017.

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**, v. 226, n. June, p. 132–140, 2017.

KAYGILI, O.; DOROZHKIN, S. V.; KESER, S. Synthesis and characterization of Ce-substituted hydroxyapatite by sol-gel method. **Materials Science and Engineering C**, v. 42, p. 78–82, 2014.

KEBİROĞLU, M. H. et al. Temperature dependent structural and vibrational properties of hydroxyapatite: A theoretical and experimental study. **Ceramics International**, v. 43, n. 17, p. 15899–15904, 2017.

KHADAR, Y. A. S. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of cobalt doped cerium oxide (CeO₂:Co) nanoparticles by using hydrothermal method. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 1, p. 267–274, 2019.

KIM, H. et al. Optimized Zn-doped hydroxyapatite/doxorubicin bioceramics system for efficient drug delivery and tissue engineering application. **Ceramics International**, v. 44, n. 6, p. 6062–6071, 2018.

KOLMAS, J.; GROSZYK, E.; KWIATKOWSKA-RÓZYCKA, D. Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

- KUMAR, V. B. et al. Silver and gold doped hydroxyapatite nanocomposites for enhanced bone regeneration. **Biomedical Materials**, v. 14, p. 1–10, 2019.
- KURTJAK, M.; VUKOMANOVIĆ, M.; SUVOROV, D. Antibacterial nanocomposite of functionalized nanogold and gallium-doped hydroxyapatite. **Materials Letters**, v. 193, p. 126–129, 2017.
- LALA, S. et al. Magnesium substitution in carbonated hydroxyapatite: Structural and microstructural characterization by Rietveld's refinement. **Materials Chemistry and Physics**, v. 170, p. 319–329, 2016.
- LEE, S. S. et al. High temperature decomposition of cerium precursors to form ceria nanocrystal libraries for biological applications. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 3, p. 424–432, 2012.
- LEEUWENBURGH, S. C. G. et al. In vitro and in vivo reactivity of porous, electrospayed calcium phosphate coatings. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3368–3378, 2006.
- LEI, Y. et al. Strontium hydroxyapatite/chitosan nanohybrid scaffolds with enhanced osteoinductivity for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 72, p. 134–142, 2017.
- LI, S. et al. Evaluation of highly carbonated hydroxyapatite bioceramic implant coatings with hierarchical micro-/nanorod topography optimized for osseointegration. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 3643–3659, 2018.
- LOWRY, N. et al. Synthesis and characterisation of nanophase hydroxyapatite co-substituted with strontium and zinc. **Ceramics International**, v. 44, n. 7, p. 7761–7770, 2018.
- MALAKAUSKAITE-PETRULEVICIENE, M. et al. Characterization of sol-gel processing of calcium phosphate thin films on silicon substrate by FTIR spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 85, p. 16–21, 2016.
- MANOJ, M. et al. Influence of Growth Parameters on the Formation of Hydroxyapatite (HAp) Nanostructures and Their Cell Viability Studies. **Nanobiomedicine**, v. 2, p. 1–11, 2015.
- MOMMA, K.; IZUMI, F. VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data. **Journal of Applied Crystallography**, v. 44, n. 6, p. 1272–1276, 2011.
- MROZ, W. et al. In vivo implantation of porous titanium alloy implants coated with magnesium-doped octacalcium phosphate and hydroxyapatite thin films using pulsed laser deposition. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 103, n. 1, p. 151–158, 2015.
- 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.

NEEL, E. A. A. et al. Demineralisation-remineralisation dynamics in teeth and bone. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4743–4763, 2016.

OUYANG, Y. et al. Structure and antibacterial activity of Ce³⁺ exchanged montmorillonites. **Journal of Rare Earths**, v. 27, n. 5, p. 858–863, 2009.

PANDEY, A. et al. Antioxidant and antibacterial hydroxyapatite-based biocomposite for orthopedic applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 88, n. January, p. 13–24, 2018.

PAPARAZZO, E. On the number, binding energies, and mutual intensities of Ce3d peaks in the XPS analysis of cerium oxide systems: A response to Murugan et al., Superlatt. Microstruct. 85 (2015) 321. **Superlattices and Microstructures**, v. 105, p. 216–220, 2017.

PHATAI, P. et al. Structural characterization of cerium-doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by an ultrasonic-assisted sol-gel technique. **Results in Physics**, v. 10, p. 956–963, 2018.

POURBAIX, M. **Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions**. Oxford: Pergamon, 1966.

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. **Materials and Design**, v. 119, p. 446–455, 2017.

PRIYADARSHINI, B.; VIJAYALAKSHMI, U. Development of cerium and silicon co-doped hydroxyapatite nanopowder and its in vitro biological studies for bone regeneration applications. **Advanced Powder Technology**, v. 29, n. 11, p. 2792–2803, 2018.

PU'AD, N. A. S. M. et al. Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. 1–14, 2019.

RAJESWARI, D. et al. Investigation of anticorrosive, antibacterial and in vitro biological properties of a sulphonated poly(etheretherketone)/strontium, cerium co-substituted hydroxyapatite composite coating developed on surface treated surgical grade stainless steel for orthopedic applications. **RSC Advances**, v. 4, n. 106, p. 61525–61536, 2014.

REN, F. et al. Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2787–2796, 2010.

REN, Y. et al. Rapid coating of AZ31 magnesium alloy with calcium deficient hydroxyapatite using microwave energy. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 364–372, 2015.

SAFARZADEH, M. et al. Effect of multi-ions doping on the properties of carbonated hydroxyapatite bioceramic. **Ceramics International**, v. 45, n. 3, p. 3473–3477, 2019.

- SCHUBERT, D. et al. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, n. 1, p. 86–91, 2006.
- SENTHILKUMAR, R. P. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of hybrid chitosan-cerium oxide nanoparticles: As a bionanomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1746–1752, 2017.
- SOBCZAK-KUPIEC, A. et al. Effect of calcination parameters on behavior of bone hydroxyapatite in artificial saliva and its biosafety. **Materials Chemistry and Physics**, v. 206, p. 158–165, 2018.
- SOBIERAJSKA, P. et al. Preparation and antimicrobial activity of the porous hydroxyapatite nanoceramics. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 748, p. 179–187, 2018.
- TAVARES, D. DOS S. et al. Incorporation of strontium up to 5 Mol. (%) to hydroxyapatite did not affect its cytocompatibility. **Materials Research**, v. 14, n. 4, p. 456–460, 2011.
- TRAMPUZ, A.; ZIMMERLI, W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. **Injury**, v. 37, p. 59–66, 2006.
- UHART, A. et al. An Auger and XPS survey of cerium active corrosion protection for AA2024-T3 aluminum alloy. **Applied Surface Science**, v. 390, p. 751–759, 2016.
- VIEIRA, E. G. et al. Síntese pelo método da coprecipitação e caracterização estrutural do tungstato de cálcio com estrutura tipo scheelita. **Cerâmica**, v. 59, p. 417–425, 2013.
- VILA, M. et al. 3D silicon doped hydroxyapatite scaffolds decorated with Elastin-like Recombinamers for bone regenerative medicine. **Acta Biomaterialia**, v. 45, p. 349–356, 2016.
- WEINER, S.; WAGNER, H. D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. **Annual Review of Materials Science**, v. 28, n. 1, p. 271–298, 1998.
- YANG, Y. C. et al. **Flame sprayed zinc doped hydroxyapatite coating with antibacterial and biocompatible properties**. [s.l.] Elsevier Ltd and Techna Group S.r.l., 2017. v. 43
- YAO, J. et al. Hydroxyapatite nanostructure material derived using cationic surfactant as a template. **Journal of Materials Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 3053–3057, 2003.
- YASUKAWA, A. et al. Preparation and structure of calcium hydroxyapatite substituted with light rare earth ions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 393, p. 53–59, 2012.
- YINGGUANG, L.; ZHUORU, Y.; JIANG, C. Preparation, Characterization and Antibacterial Property of Cerium Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles. **Journal**

of Rare Earths, v. 25, p. 452–546, 2007.

ZHANG, J. et al. Effects of cerium oxide nanoparticles on the proliferation, differentiation, and mineralization function of primary osteoblasts in vitro. **Journal of Rare Earths**, v. 28, n. 13, p. 138–142, 2010.

CAPÍTULO 4: ESTUDO EXPERIMENTAL

Preparação de um *scaffold* baseado na hidroxiapatita dopada com cério/quitosana para aplicações em engenharia tecidual óssea

Resumo

A hidroxiapatita (HA) é uma cerâmica biocompatível que estimula o crescimento ósseo. Uma das alternativas para melhorar as suas propriedades estruturais é através da sua associação com biopolímeros, tais como a quitosana (QT). Assim, buscou-se investigar os efeitos da interação entre a QT e HA dopada com Ce (Ce-HA). *Scaffolds* baseados na QT e HAs foram obtidos a partir de hidrogéis liofilizados. Os materiais estruturados SCF-HA e SCF-Ce-HA foram caracterizados por FTIR, TG/DTG, MEV, ensaio de degradação em PBS e ensaio mecânico. O FTIR e a TG/DTG confirmaram a ocorrência de possíveis interações químicas entre a HA e a QT. O estudo de degradação *in vitro* em PBS mostrou que o material não sofreu perdas consideráveis de massa após o período de 28 dias. O módulo de Young encontrado foi de $6,10 \pm 0,03$ MPa, com tensão máxima de $5,67 \pm 0,03$ MPa e deformação de $92,44 \pm 0,70$ %. O MEV mostrou que os materiais possuem poros interconectados (Tamanho médio = $244,81 \pm 152,52$ μm ; Área de porosidade = $33,34 \pm 8,36\%$). O ensaio de MTT revelou que a dopagem com cério potencializou os efeitos de biocompatibilidade. Para as cerâmicas HA e Ce-HA o nível de confluência celular foi de $89,4 \pm 1,00\%$ e $99,1 \pm 3,2\%$, respectivamente. Para o *scaffold* QT/Ce-HA a viabilidade celular foi superior a 80%, após 72 h. O material foi classificado como sendo não tóxico.

Palavras-chave: *scaffold*, dopagem, cério, reticulação polieletrólítica.

1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos ⁶aplicada à substituição e/ou regeneração óssea se revela como sendo uma área promissora que traz consigo alternativas que são capazes de contornar limitações provenientes das terapias convencionais (CHOCHOLATA; KULDA; BABUSKA, 2019).

A fim de solucionar problemas relacionados à incidência atual de doenças causadas perda de massa óssea como as infecções, fraturas, tumores e traumas, dada a escassez de doadores e possibilidade de rejeição no uso clínico de enxertos ou preenchimentos ósseos (FRAGAL et al., 2016; RIBEIRO et al., 2015), formulações de novos biomateriais, na forma de biocompósitos baseados em polímeros pode ser uma alternativa interessante (CABALLERO et al., 2019; RIBAS et al., 2019).

Logo, associando-se princípios da engenharia e biologia, com o intuito de recriar ou reparar tecidos danificados, a demanda pelo desenvolvimento de uma variedade de biomateriais, naturais e sintéticos, ativos funcionalmente, tem sido crescente. Portanto, a escolha de um polímero com propriedades físico-químicas, com biocompatibilidade adequadas é uma etapa crítica para aplicações na engenharia de tecidos (RAINA et al., 2016).

Os poli(α -hidróxi ácidos), polímeros sintéticos, são um exemplo da classe desses polímeros biodegradáveis e bioreabsorvíveis, utilizados na engenharia de tecidos. Porém, possuem pouca resistência mecânica e sofrem redução de tamanho ao longo do tempo, acrescido a sua questionável interação com as células com possibilidade de reação tóxica local pela liberação de produtos ácidos de degradação (ABUKAWA et al., 2006; OH et al., 2006; PRECHEUR, 2007).

Como alternativa de substituição, a quitosana (QT), um biopolímero natural, tem sido amplamente investigada e utilizada por suas aplicações clínicas e biomédicas associadas à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, biofuncionalidade e não-toxicidade (HE et al., 2017). Trata-se de um polissacarídeo catiônico obtido pela desacetilação de unidades monoméricas da quitina (N-acetil-D-glucosamina) (CAZÓN et al., 2017; JEONG et al., 2017) que é amplamente empregada na fabricação de curativos, como agente hemostático, em sistemas para liberação controlada de fármacos, como agente antimicrobiano, em formulações de

⁶ É a ciência aplicada que utiliza conhecimentos de biologia, química e física para desenvolver tecidos artificiais.

hidrogel, conservante de alimentos e na engenharia de tecidos (FERREIRA et al., 2016; OSÓRIO et al., 2018; RADHAKUMARY; ANTONY; SREENIVASAN, 2011).

Já a hidroxiapatita (HA), $[Ca_{10}(PO_4)_6OH_2]$, uma biocerâmica bioativa, biocompatível, biodegradável, não-tóxica e osteocondutora, é utilizada no tratamento de danos e defeitos ósseos, em especial por, contribuindo para a otimização da fixação de implantes (AKTUĞ et al., 2017; SALIMI; ANUAR, 2013). Possui similaridade à apatita biológica presente em ossos e dentes, podendo ser natural ou sintética, esta última sendo sintetizada na razão Ca/P entre 1,50 a 1,67, que favorece os mecanismos de crescimento ósseo (SEKINE et al., 2017; TAKTAK et al., 2018; YANG et al., 2017).

Uma grande vantagem da utilização dos fosfatos de cálcio na engenharia do tecido ósseo é de possuir biocompatibilidade com os tecidos duros, há também biocompatibilidade com tecidos moles como a gengiva, pele e músculos (IBRAHIM et al., 2017; RIBEIRO et al., 2015). Além da sua utilização na engenharia do tecido ósseo, a hidroxiapatita e outros fosfatos de cálcio tem utilização vasta no revestimento de próteses e como cimentos em procedimentos de restauração dentária (SANTOS; OSAJIMA; DA SILVA FILHO, 2010).

A princípio é necessário considerar a forma em que se almeja obter o compósito final, tais como *scaffolds*, discos, filmes, hidrogéis, pós, entre outros. Normalmente, a potencial aplicação a que se destina o material compósito norteará a forma e, também o método de manufatura escolhido. Nas formulações de biocompósitos baseado na QT/HA, a QT, que corresponde à matriz, possui diversos usos que variam da excipientes farmacêuticos até aplicações em engenharia de tecidos (DINESCU et al., 2014; KOÇ DEMIR; ELÇIN; ELÇIN, 2018; SARAVANAN; LEENA; SELVAMURUGAN, 2016).

Dessa maneira, a flexibilidade deste biopolímero limita suas aplicações, uma vez que isoladamente não suporta cargas de forma similar ao osso natural, de modo que a HA, além de possuir similaridade à porção mineral dos ossos, contribui com resistência e dureza, é bioativa e favorece a osteocondução, no caso de aplicações em engenharia do tecido ósseo (KHOR; LIM, 2003; REZWAN et al., 2006).

A falta de propriedades mecânicas suficientes ou ruins nos compósitos estruturados reduzem suas aplicações médicas; logo, uma das alternativas para melhorar essas propriedades é através da reticulação linear, um método geralmente

utilizado para modificar propriedades mecânicas, biológicas e de degradação dos hidrogéis (GUARESTI et al., 2018; XU et al., 2017). Devido à fácil disponibilidade dos grupos amino na quitosana, ela pode interagir com as cargas negativas da superfície da hidroxiapatita, formando complexos polieletrólíticos (CPE), uma alternativa para a formação de ligações cruzadas (SHAKIR et al., 2015; SHAKIR et al., 2018). Assim, o objetivo principal da reticulação ou da formação de um CPE é melhorar as propriedades biomecânicas dos *scaffolds* através da formação de uma rede firme de matriz polimérica sem a utilização de agentes químicos reticulantes que muitas vezes possuem efeitos tóxicos (ORYAN et al., 2018).

A formulação de compósitos contendo proporções desses dois biomateriais (HA + QT) parece ser uma alternativa interessante, uma vez que será possível unificar as principais propriedades de biocompatibilidade, de bioanabólica, osteogênicas, osteocondutoras e osteoestimulantes (GRADO et al., 2018), com possibilidades de fabricação dos materiais com propriedades mecânicas adequadas para aplicações diversas na área da engenharia tecidual óssea.

Por fim, outra alternativa eficaz para multiplicar os efeitos de biocompatibilidade desses biocompósitos é a adição de dopantes na estrutura da HA. Estudos mostram que a adição de dopantes à HA causa efeitos não tóxicos ao material e potencializam as atividades de proliferação celular (KIM et al., 2018; VLADESCU et al., 2016). Assim, o presente trabalho tem como objetivo investigar os efeitos da interação polieletrólítica entre a QT e HA dopada com Ce (Ce-HA) para formulações de um *scaffold*, bem como investigar suas propriedades mecânicas, químicas e biológicas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais

A síntese e caracterização da HA e Ce-HA foram descritas no Capítulo 3 desse estudo e a quitosana (Primex) utilizada possui grau médio de desacetilação de 78%. Para os experimentos de viabilidade celular utilizou-se a linhagem celular GM07492 (fibroblasto humano), células/poço: 1×10^5 , meio de cultura DMEM (Gibco/Thermofisher), suplementado com soro bovino fetal (SBF) (nutricell), DMSO (Sigma-Aldric), MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) (Sigma-Aldric), penicilina e estreptomicina 10U/mL (Sigma-Aldrich. Os reagentes não passaram por processo de purificação prévia e a água utilizada para os processos de síntese foi obtida pela purificação em um sistema Milli-Q.

2.2 Preparo dos *scaffolds*

Inicialmente, foram pesados aproximadamente 2,00 g de QT que foram dissolvidos, sob agitação magnética, em 100,0 mL de uma solução de ácido láctico a 0,25% (v/v) em um béquer de 250 mL. Após completa dissolução do polissacarídeo, foi adicionado ao sistema, aproximadamente 1,00 g de HA para a promoção da interação entre os materiais (reticulação polieletrólítica). A obtenção do hidrogel foi alcançada após um tempo de mistura de aproximadamente 2 h.

Após obtenção do hidrogel, com auxílio de uma micropipeta, cerca de 2000 μL do hidrogel foram dispostos em placa de 24 poços que foi levada ao freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. A fabricação das matrizes porosas (*scaffolds*) foram realizadas através do processo de *freeze-dried* (liofilização) por cerca de 8 h. Para a interação e formação do hidrogel QT/Ce-HA, os procedimentos, anteriormente relatados, foram repetidos. Assim, os *scaffolds* SCF-HA e SCF-Ce-HA, de diâmetro médio de 10 mm e altura de 5 mm, foram obtidos. A Figura 1 traz o esquema resumo para a fabricação dos materiais obtidos após o processo de liofilização.

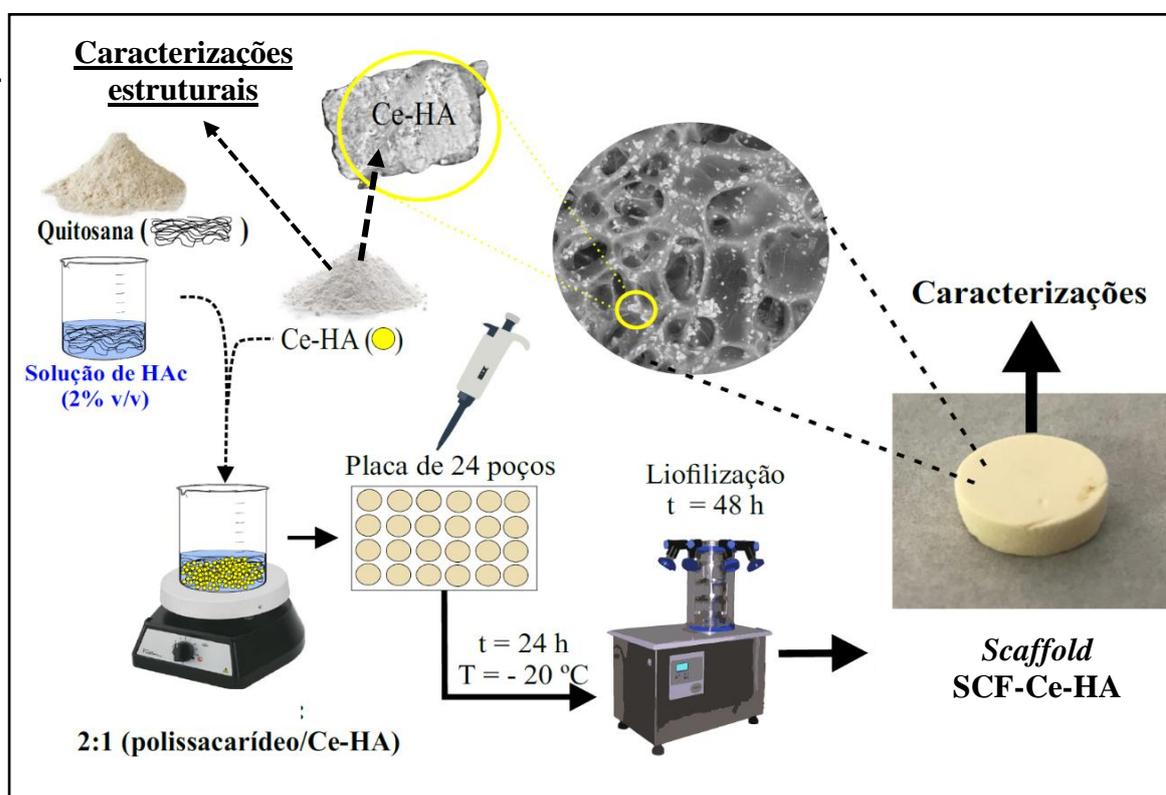


Figura 1. *Scaffold* à base de quitosana e hidroxiapatitas (HA e Ce-HA) obtido após processo de liofilização.

2.3 Caracterizações

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

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier foi realizada em um Espectromêtro 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 HAs e os *scaffolds* 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.

2.3.2 Análise termogravimetria (TG)

As curvas TG foram realizadas no equipamento SDT Q600 V20.9 Build 20 da TA Instruments utilizando aproximadamente 5 mg de amostra com razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} (25 a 1000 °C), em atmosfera de argônio, com fluxo de 100 mL min^{-1} em porta amostra de alumina.

2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplado a 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). A análise elementar por espectroscopia de dispersão de energia (EDS) foi realizada usando uma sonda EDAX Apollo X anexada ao MEV.

2.4 Estudo de degradação *in vitro*

O estudo de degradação *in vitro* correu pela imersão dos *scaffolds* em tampão fosfato-salina (*phosphate buffered saline* – PBS). Os *scaffolds* foram pesados em uma balança analítica e, então, as amostras foram imersas na solução de PBS a 37 °C em uma estufa. O período de realização do estudo de degradação ocorreu em três semanas, como o seguinte intervalo de tempo: 1, 7, 14, 21 e 28 dias. A solução de PBS foi trocada a cada 7 dias e a remoção do PBS foi realizada por lavagem com água deionizada. Após lavagem, os materiais eram seco em estufa por 80 °C para

retirada da água e obtenção de uma massa constante do material. O estudo de degradação foi calculado utilizando a Equação 1:

$$\% \text{perda de massa} = \frac{(M_i - M_f)}{M_f} * 100\% \quad (1)$$

onde M_i é a massa inicial do *scaffold* e M_f é a massa final do *scaffold* após imersão e secagem em estufa.

2.5 Ensaio mecânico de compressão

Os ensaios mecânicos de compressão foram realizados nos *scaffolds* de área cilíndrica (10 mm de diâmetro e 5 mm de altura), a uma velocidade de 1 mm/min. Os testes foram realizados em equipamento servo-hidráulico para ensaios mecânicos SHIMADZU: AG-X 250 kN, no Laboratório de Ensaio Mecânicos do Instituto Federal do Piauí (IFPI) (ASTM Standards D 2990 – 01).

2.6 Teste de viabilidade celular

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium) (ISO 10993-5:2009). As células de fibroblastos humanas (GM07492) foram semeadas em placa de cultura de 12 poços enriquecidas com 500 μL de meio Alpha Medium (α -MEM) suplementado com antibiótico, soro bovino e glutamina e encubadas em estufa a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico por 48 h. Os materiais foram pesados, esterilizados, imersos em meio de cultura (20 mg/mL) e mantidos a 37 °C durante 24 h para realizar os procedimentos de extração (TAVARES et al., 2011). Os poços foram lavados com PBS (1x), depois passaram por incubados com o seguinte intervalo: 24, 48 e 72 horas. A cada período foi adicionado 10% de MTT diluído em meio α -MEM. A placa de cultura foi novamente incubada em estufa por mais 5 h. O sobrenadante foi descartado e adicionado 500 μL de DMSO em todos os poços. 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) foram obtidos em um comprimento de onda (λ) de 550 nm num espectrofotômetro, leitora de placa Biotek, (modelo Elx800). Os efeitos de citotoxicidade foram expressos em termos de porcentagem usando a Equação 2, o grupo controle considerado foi considerado como sendo 100% de viabilidade celular (KIM et al., 2018). Como controle positivo foram usados α -MEM + DMSO e como controle negativo, foram usados α -MEM + soro bovino fetal + antibióticos. Os dados

foram submetidos a análise estatística (ANOVA-ONEWAY e FISHER'Spost hoc test) com nível de significância de 5%. Os ensaios foram realizados no Núcleo Integrado de Morfologia E Pesquisas com Células-Tronco (NUPCelt/CCA/UFPI).

$$DO(\%) = \left(\frac{\text{Absorção das células tratadas}}{\text{Absorção das células controle}} \right) * 100\% \quad (2)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos scaffolds

Após confirmação e a obtenção bem-sucedida da fase hidroxiapatita, os *scaffolds* QT/HA e QT/Ce-HA foram formados, e após processo de liofilização, foram caracterizados. A Figura 1 mostra os espectros de FTIR dos *scaffolds*. Nos espectros dos *scaffolds* SCF-HA e SCF-Ce-HA, é possível perceber facilmente a presença tanto de bandas características da HAs, quanto a presença das bandas referentes a QT. As vibrações características da HA (Figura 1a) são observadas no espectro do compósito (Figura 2b e 2c), assim como, bandas características da QT que podem ser um indicativo de uma possível interação bem-sucedida entre o material cerâmico e o polissacarídeo.

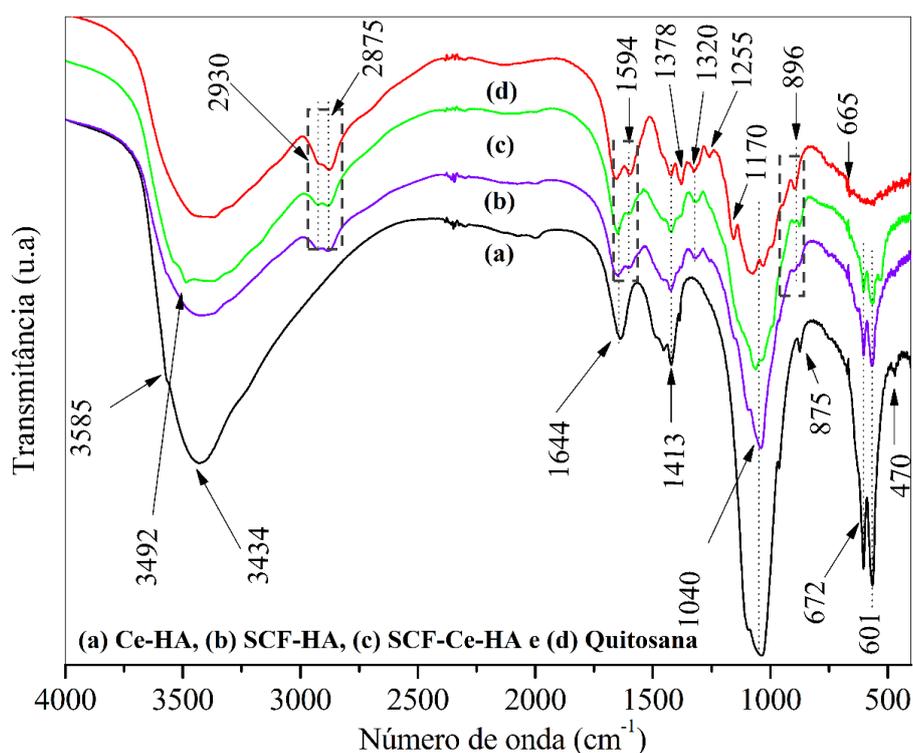


Figura 2. FTIR da (a) Ce-HA, (b) SCF-HA, (c) SCF-Ce-HA e (d) quitosana.

A banda em 3492 cm^{-1} , refere-se a estiramento do tipo N-H. As bandas bem acentuadas nas regiões entre 2930 cm^{-1} e 2875 cm^{-1} , que corresponde a estiramento do tipo C-H, são observadas com destaque na quitosana, mas não aparecem no espectro do material Ce-HA. Na região de 1594 cm^{-1} é observado uma deformação angular simétrica no plano dos grupos $-\text{NH}_2$. A banda 1305 cm^{-1} , corresponde a

estiramento do tipo C-O característico também da quitosana. Por fim, na região próxima a 896 cm^{-1} , encontra-se uma banda característica da vibração dos grupos -NH_2 da QT (SENTHILKUMAR et al., 2017). Portanto, as bandas no espectro do *scaffold* (Figuras 2b e 2c) revelaram a formação do compósito, nas quais, essas novas bandas estão caracterizando a nova formulação, ou seja, algumas bandas características da QT e da HA, quando esses materiais se encontravam em composição única, são percebidas.

A análise termogravimétrica (TG) foi realizada com a finalidade de investigar a estabilidade térmica e possíveis interações entre as HAs e a QT. As curvas TG e DTG estão dispostas na Figura 3. Observa-se, nas curvas TG e DTG (Figura 3a) da QT, que as primeiras perdas de massa ocorreram em torno de 85 °C e corresponderam à vaporização das moléculas de água adsorvidas. Geralmente, polissacarídeos possuem uma forte afinidade com as moléculas de água. Na QT, as moléculas de água podem se ligar a grupos hidroxila ou amina presente no esqueleto macromolecular (SHAMEKHI et al., 2017).

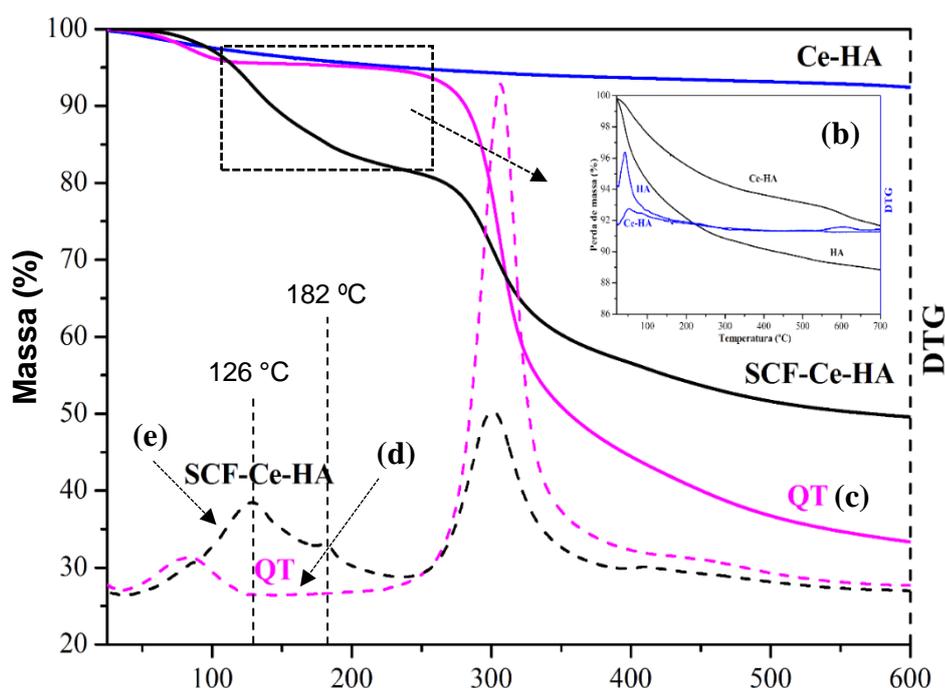


Figura 3. TGA da amostra (a) SCF-Ce-HA e curva TGA ampliada das amostras (b) HA e Ce-HA, (c) TGA da QT e DTG para a (d) QT e para o (e) SCF-Ce-HA.

O evento térmico da QT, superiores a 85 °C até 270 °C , proporcionaram a perda de aproximadamente 21% de massa e o pico térmico da primeira diferencial na

região de 306 °C, revelou que esse evento corresponde a degradação, a desacetilação, despolimerização, desidratação dos anéis sacarídeos e decomposição de unidades de polímeros (ALVES et al., 2018; DEMIR; ELÇIN; ELÇIN, 2018). Esse mesmo pico é observado na curva térmica derivada do SCF-Ce-HA e, nessa mesma curva (Figura 3c), não foram percebidas perdas de água, uma vez que o mesmo passou pelo processo de liofilização.

Na Figura 3b, tem-se a curva TG e DTG ampliada para as amostras de HA e Ce-HA. A perda de massa relacionada entre a faixa de aquecimento entre 42 °C até 100 °C pode ser atribuída a perda de água fisicamente adsorvida na superfície. Esse primeiro evento térmico ocorre até aproximadamente 260 °C, com perda de massa de aproximadamente 19%. Acima desta temperatura, na faixa de 100 °C até 600 °C, ocorre outro evento térmico referente ao início da condensação de grupos hidroxilas características da fase hidroxiapatita. Essa condensação também foi observada no Ce-HA e proporcionou perda de 21% de massa de HA contida na amostra. Para esse estudo a composição de materiais utilizada no processo de fabricação do *scaffold* foi de 20:80 (HA/QT m/m%). Essas perdas de massa revelaram que o *scaffold* é constituído por cerca de 80% de polissacarídeo e, ao se comparar a estabilidade entre as amostras de hidroxiapatita, a Ce-HA apresentou uma maior perda de massa percentual que pode ser justificada devido à liberação de íon OH⁻. Se mostrando, proporcionalmente, menos instável termicamente quando em comparação a TG da HA (Figura 3b).

Os picos em 126 °C e 182 °C na DTG, destacados na Figura 3, da amostra SCF-Ce-HA não foram identificados nas curvas de TG/DTG da QT e das amostras HA e Ce-HA. Observa-se que existiu uma separação desses eventos entre as curvas DTG da QT (Figura 3d) e a DTG do SCF-Ce-HA (Figura 3e). Isso é um indicando razoável de que um novo evento térmico para o biocompósito sintetizado foi formado. O surgimento desses novos eventos pode ser atribuído a possíveis interações químicas intermoleculares devido à fácil disponibilidade dos grupos amino na QT.

Essas observações corroboram com os dados obtidos e discutidos na caracterização por FTIR. Além disso, esse indicativo pode ser também justificado por trabalhos que indicam a ocorrência de interação intermolecular do tipo ligação hidrogênio entre a QT e a HA (SHAKIR et al., 2015; SHAKIR et al., 2018). Outro indício aponta que a OH, das cadeias poliméricas da QT, possam estar interagindo com os grupos -NH₂ e -NH₃⁺ (grupos protonados) de outras cadeias do polissacarídeo e a

HA, o que auxilia no fortalecimento desse tipo de interação. Acredita-se que as partículas de HAs possam estar atuando como potencializadoras de cargas superficiais. Portanto, existe relatos da existência de possibilidades de formação de ligações de interação entre os grupos -NH_2 da QT e o Ca^{2+} da HA (MONREAL ROMERO et al., 2013; VENKATESAN; KIM, 2010). A Figura 4 retrata uma posposta-esquema para as interações ocorrendo entre a superfície da HA e alguns grupos químicos da QT.

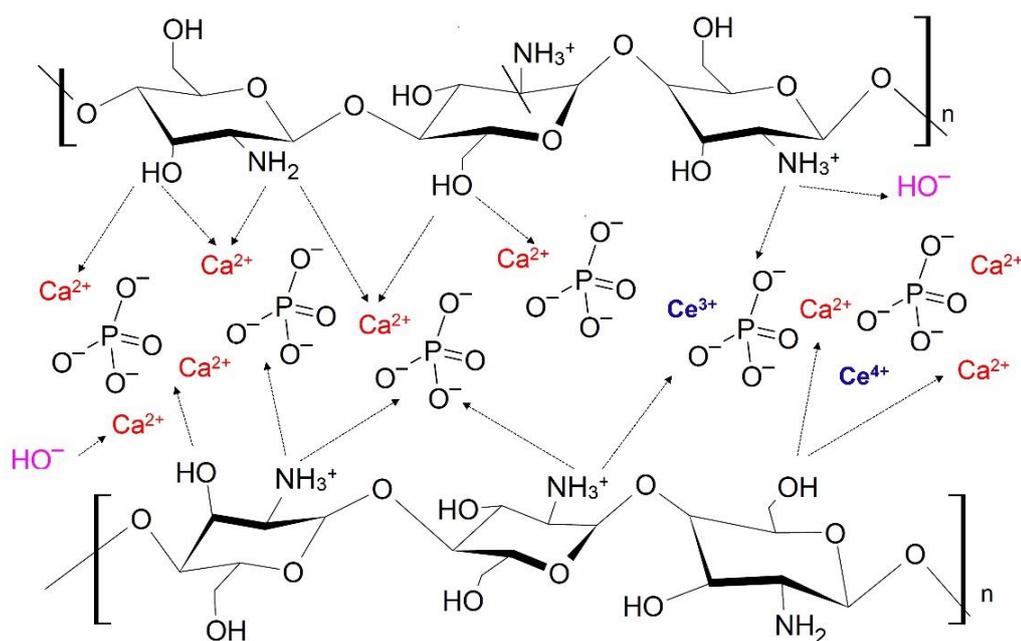


Figura 4. Possível interação entre a hidroxiapatita e os grupos químicos da quitosana.

A investigação morfologia e da porosidade do *scaffold* foi realizada através do MEV (Figura 5). A Figura 5a é referente a partículas de Ce-HA. A imagem mostra as partículas formando aglomerados não uniformes com superfície irregular. Na Figura 5b, observar-se que essas partículas, referentes a HA, encontram-se agregada na superfície do biopolímero. Na Figura 5c, percebe-se a distribuição da biocerâmica de forma bastante dispersa ao longo do material. Os pontos verdes (Figura 5d) destacam, em outra percepção, a dispersão das partículas de Ce-HA.

Uma boa característica dos *scaffolds* é um dos requisitos para sua utilização na engenharia de tecido ósseo é possuir características porosas, com presença de macroporos com tamanho superior a $100\ \mu\text{m}$, para permitir a migração celular e colonização/vascularização do *scaffold*, e interconectividade tridimensional (3D) dos seus poros, para permitir perfusão de fluidos biológicos e de nutrientes para as células

(LABATE et al., 2017). A presença dos poros é facilmente percebida nas Figura 5c, 4d e 4e. Na Figura 4e, temos a microscopia apresentada em perceptiva 3D, na qual revelou que o material possui a característica de interconectividade dos seus poros.

O espectro EDS, mostrado na Figura 6 para o *scaffold*, revelou a composição, de forma qualitativa. Os íons Ca, P, O, provenientes da hidroxiapatita foram detectados e foi possível também observar a presença dos íons de cério incorporados na dopagem da Ce-HA. Os demais íons (C, N e O) são provenientes da composição da QT. Dados fornecidos pelo EDS relativos à porcentagem atômica têm sido utilizados para obtenção da razão Ca/P de hidroxiapatita sintetizada (KANCHANA; NAVANEETHAN; SEKAR, 2017; REN et al., 2015; YANG et al., 2017).

Os dados obtidos no EDS mostram que a razão semi-quantitativa (Ca+Ce)/P presente no SCF-Ce-HA é de 1,93. Esse valor semelhante ao relatado por Santos e colaboradores (SANTOS et al., 2019); além disso, esse resultado condiz com valores relatados para hidroxiapatita encontrada no organismo humano ao se comparar cristalinidade e teor de cálcio, pois não possuindo a elevada estabilidade da hidroxiapatita com alta cristalinidade que tem razão Ca/P igual a 1,67 (SOBCZAK-KUPIEC et al., 2018), consegue interagir com maior facilidade com os fluidos fisiológicos corporais (ARIFTA et al., 2017; OKADA; MATSUMOTO, 2015).

Após tratamento pelo *software ImageJ*, os tamanhos médios dos poros e a variação da porosidade do material foram estimadas. Uma frequência muito grande de poros com abertura entre 130 μm a 235 μm (cerca de 78%) foram observados, seguidos de 10% de poros com abertura variando entre 300 μm a 410 μm . A porosidade do osso cortical varia de 5% a 30%, enquanto a porosidade do osso esponjoso varia de 30% a 90%. Os valores, para o tamanho médio total, ao se analisar cerca de 1399 poros em cinco áreas distintas do material, foi de $244,81 \pm 152,52 \mu\text{m}$ com poros variando entre 130 a 930 μm e a sua área de porosidade média total foi estimada em torno de $33,34 \pm 8,36\%$. A Figura 7 traz uma melhor representação desses valores.

A porosidade óssea não é fixa e pode mudar em resposta a carga, doença e envelhecimento alterados. Tecnicamente, a estruturação dos *scaffolds* geralmente têm que possuir área de porosidade suficientemente grande, juntamente com tamanhos apropriados dos poros, preferencialmente nas formas regulares e interconectadas para permitir a vascularização, proliferação celular e migração. Amplas faixas de tamanhos de poros (10 μm a 1000 μm) têm sido relatadas e são

considerados adequados para formação e regeneração de tecido ósseo (SHAVANDI et al., 2016).

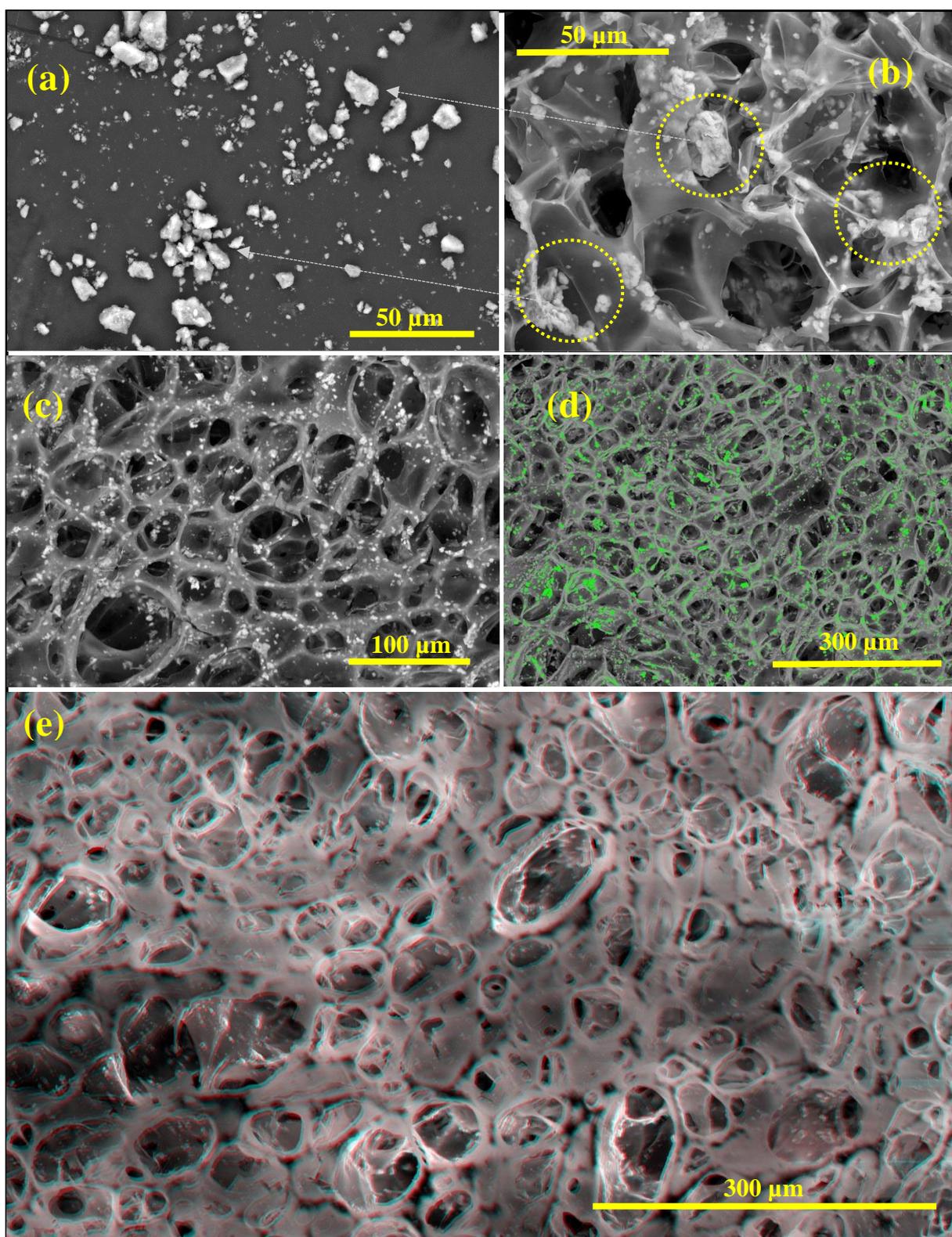


Figura 5. MEV para (a) Ce-HA, (b-d) SCF-Ce-HA e (e)* imagem 3D do SCF-Ce-HA. (*Para melhor perspectiva visual, os autores recomendam que os leitores utilizem óculos tipo ciano e vermelho).

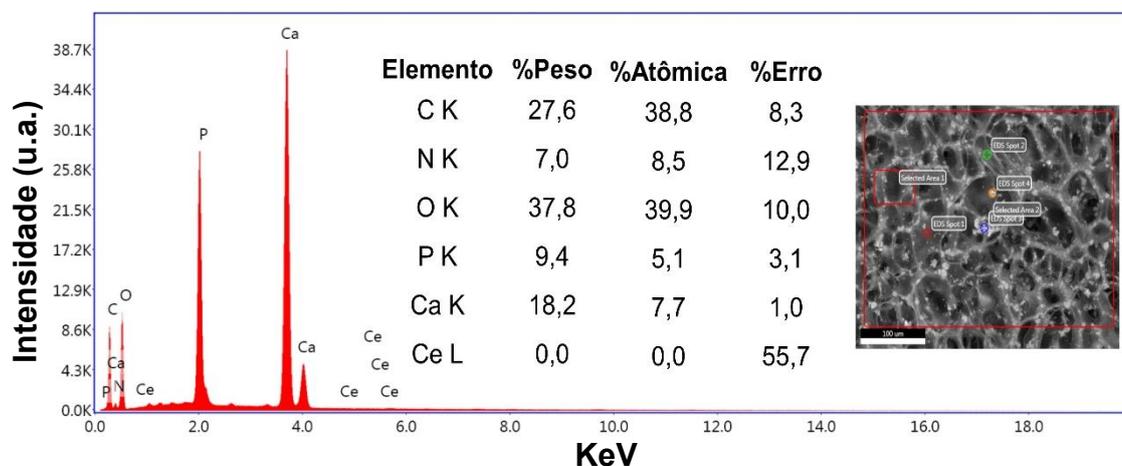


Figura 6. EDS do *scaffold* formulado com QT/Ce-HA.

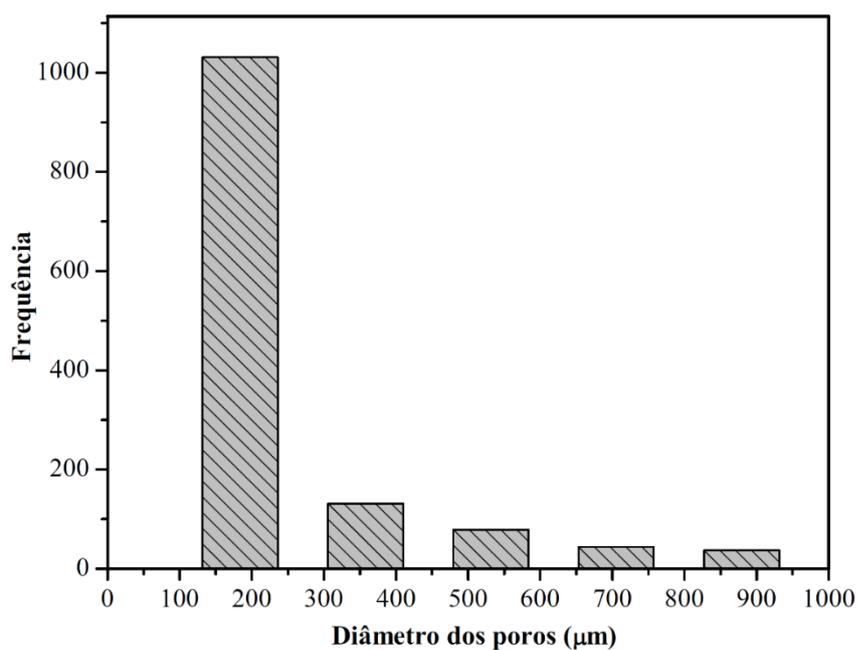


Figura 7. Distribuição do tamanho dos poros do SCF-Ce-HA.

Outros autores também relatam que *scaffolds* com tamanhos de poros entre 78-382 μm são essenciais para a vascularização, como suporte e interação de células fibroblásticas e propiciação à proliferação e diferenciação de células troncos em linhagens osteoblásticas (MAJI et al., 2018; O'BRIEN et al., 2005). Um estudo *in vivo* relatou também que *scaffolds* com poros médios em torno de 215 μm melhoram significativamente a proliferação e produção da matriz extracelular (deposição de

células-tronco mesenquimais) (ZHANG et al., 2016). Os resultados desse estudo encontram-se nas faixas de variação de tamanhos de poros relatados por esses e outros estudos. A Tabela 1 traz uma comparação com os valores encontrados nesse trabalho com outros já publicados na literatura.

Tabela 1. Tamanho médio dos poros e área de porosidade do SCF-Ce-HA.

Material	Porosidade (%)	Tamanho médio dos poros (μm)	Referências
SCF-Ce-HA	33,34 \pm 8,36	244,81 \pm 152,52	♦
Osso esponjoso humano	75-85	300-600	HADAVI et al., 2017
Osso cortical humano	5-10	10-50	HADAVI et al., 2017
HA/QT	90	200-700	TSIOURVAS et al., 2016
HA/QT	77-79	72-138	MOATARY et al., 2017
β -TCP/QT	80	78-382	MAJI et al., 2018
n-HA/QT	93	121-595	MAJI et al., 2018
HA-CaCO ₃ /QT	91	200	CHEN et al., 2018
β -TCP/QT	70-82	212	SHAVANDI et al., 2016

♦ = valores encontrados pelos autores.

3.2 Degradação *in vitro* e propriedades mecânicas

Um dos grandes problemas para aplicação desses tipos de materiais na área da engenharia tecidual é o desenvolvimento de *scaffolds* capazes de fornecer propriedades mecânicas adequadas após o implante. Essas propriedades são altamente influenciadas pela estrutura e tamanho de poros, e a variação na propriedade mecânica devido ao processo de degradação do biomaterial, deve ser compatível com o processo de regeneração óssea (PRASADH; WONG, 2018). Assim, o SCF-Ce-HA passou por uma avaliação quanto a sua degradação *in vitro* e aos seus módulos mecânicos (módulo de elasticidade (E) (módulo de Young) e tensão máxima (σ)). O resultado do estudo de degradação por imersão do *scaffold* em PBS é mostrado na Figura 8. Essas informações foram obtidas comparado os valores da M_i com a M_f (Equação 1).

O estudo revelou que o material, após um período de 28 dias de degradação, não sofreu grande perda de massa, sendo observado uma variação de perda de massa degrada constante ao final do período estudado. Nas primeiras 24 horas do estudo, o material perdeu, em média, cerca de 13% de massa. Porém, ao longo desse

estudo foi observada uma pequena tendência de ganho de massa no material (grau de intumescimento), entre o dia 1 para o dia 7 e do dia 14 para o dia 21. Esses ganhos médios de massa foram de aproximadamente 0,18% e 2,30%, respectivamente. Acredita-se que este fato decorra provavelmente por conta da penetração do líquido nos poros do *scaffold* e da interação da água (através de ligações de hidrogênio) com grupos químicos da QT ($-\text{NH}_3^+$, NH_2 e $-\text{OH}$). Os grupos $-\text{NH}_3^+$ estão presentes, principalmente, nas unidades de glucosamina da QT com pH inferior a 7,2 (CRUZ et al., 2016).

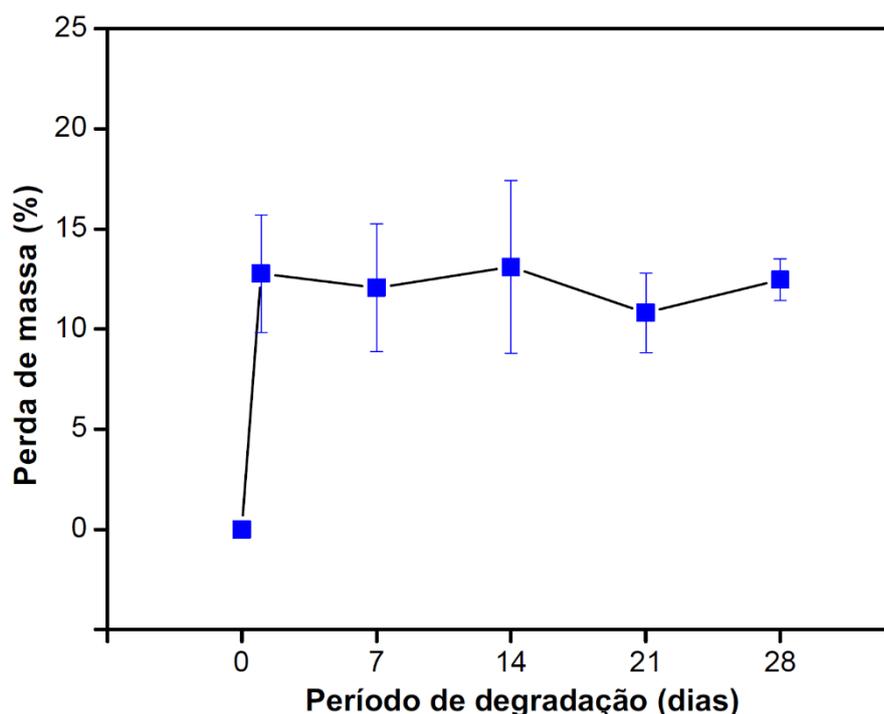


Figura 8. Estudo *in vitro* da perda de massa do *scaffold* em meio PBS pelo seguinte período de tempo: 1, 7, 14, 21 e 28 dias.

Segundo Deb et al (2019), a presença da HA constituindo o biocompósito pode ser um fator fundamental para esse ganho de massa observado, o que pode ter influenciado a não observação de uma taxa de degradação crescente (DEB et al., 2019). Santos e colaboradores relatam que essa tendência é existente pois a HA é capaz de adicionar propriedades interativas de superfície junto aos constituintes iônicos que compõe o meio de imersão (PBS). Logo, isso pode acarretar em uma capacidade extra de absorção de PBS por parte do *scaffold* (SANTOS et al., 2019).

O teste mecânico ocorreu através do ensaio de compressão. O ensaio de tração mostrou que o módulo de Young do Ce-SCF-HA foi de $6,10 \pm 0,03$ MPa. A força

máxima de tensão foi de $5,67 \pm 0,03$ MPa, com deformação (ϵ) máxima entre de $92,44 \pm 0,70$ %. Os valores encontrados por Heidari et al (2018), para um compósito constituído de ferrita, HA e QT, foram de $\sigma = 2-10$ MPa e $\epsilon = 73,50\%-82,50\%$ (HEIDARI et al., 2018). Li et al., 2018, encontraram os valores de σ e E iguais a $1,40-1,84$ MPa e $88-132$ MPa, respectivamente, para *scaffolds* a base de nano-HA e QT (LI et al., 2018). Outras composições contendo HA e grafites/grafenos obtiveram valores de σ igual a $3,60-3,80$ MPa (KANHED et al., 2017) e $3,30$ MPa (LI et al., 2018). Variações m/m% na composição entre a QT/HA podem gerar diferente valores de resistência à compressão (LI et al., 2005). Por exemplo, composições contendo 30:70 (m/m %) de QT/HA podem assumir valores de σ igual a $119,86$ MPa. Já para compósitos formulados por 70:30 (m/m %) de QT/HA, esses valores são próximos a $66,64$ MPa (LI et al., 2005). Para esse estudo a composição final foi de 80:20 (m/m%).

Follet et al (2014), relatam que os valores de σ e E para o osso esponjoso humano variam entre $0,28-11,61$ MPa e $19-1257$ MPa, respectivamente (FOLLET et al., 2004). Zhao e Liang (2017), relatam que a resistência à compressão do osso esponjoso humano varia entre $1,9-7,0$ Mpa (ZHAO; LIANG, 2017). Para Prasad e Wong (2018), a força média do osso cortical varia entre 100 e 230 MPa. Uma comparação entre os valores obtidos e os valores encontrados na literatura é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação entre módulos de compressão e elasticidade da SCF-Ce-HA, osso esponjoso e osso cortical.

Amostra	Tensão (MPa)	Módulo Elástico (MPa)	Referências
SCF-Ce-HA	5,64 – 5,70	6,07 – 6,13	♦
Osso Esponjoso	4 – 12	$(0,1 - 0,5) \times 10^3$	REZWAN et al., 2006; YANG et al., 2014
	20 – 500	$(8 - 50) \times 10^3$	HADAVI et al., 2017
Osso Cortical	130 – 180	12 – 18	REZWAN et al., 2006; YANG et al., 2014
	10 – 150	$(14 - 20) \times 10^3$	HADAVI et al., 2017

♦ = resultado obtido pelos autores desse estudo

Os *scaffolds* obtidos nesse estudo foram fabricados sem a utilização de agentes reticulantes químicos. A falta de propriedades mecânicas suficientes boas ou ruins, como baixa estabilidade mecânica, por exemplo, pode reduzir as suas aplicações

médicas. A hidroxiapatita, como uma cerâmica biologicamente ativa, possui propriedades mecânicas pobres, como baixa tenacidade à fratura e tração limitada, dessa forma, as áreas de aplicações são limitadas (LI et al., 2018). Assim, a reticulação linear (*crosslink*) químicas ou físicas entre cadeias poliméricas é um método simples e bastante utilizado para modificar propriedades mecânicas, biológicas e de degradação de hidrogéis.

Embora a reticulação através de reações químicas melhore as propriedades mecânicas dos substitutos ósseos, a maioria dos reagentes utilizados para este fim demonstram efeitos indesejáveis e podem exercer reações tóxicas. O glutaraldeído, por exemplo, é um dos principais reticuladores químicos e um dos mais amplamente utilizados (LIU; WANG; ZHANG, 2017; SHAMEKHI et al., 2017; YANG et al., 2017). Uma pesquisa básica e de caráter qualitativo no banco de dados SCOPUS realizada no mês de agosto de 2019, utilizando os termos “*glutaraldehyde AND cross-linking*”, voltada para aplicações na área de materiais, revelou que no período entre os anos de 2009 a 2019 existem cerca de 1999 estudos científicos relacionados ao tema.

Entretanto, muitas visões contraditórias foram recentemente levantadas sobre seus efeitos citotóxicos devido a sua alta toxicidade celular, por ser considerado um material de alto risco para a saúde pública e uma grande necessidade de sucessivas lavagens com soluções específicas para a eliminação do seu excesso e a sua presença pode causar alterações na cor dos *scaffolds* (ORYAN et al., 2018). Assim, a associação da HA e QT mostra-se ser uma alternativa no mínima razoável para melhorar os módulos de elasticidade, resistência à tração e compressão, módulo de flexão, tensão máxima e fadiga. Assim, podendo os *scaffolds* fabricados nesse estudo serem aplicados *in vivo* com ou sem auxílios de outros biomateriais, tais quais, placas, parafusos, fios ou pinos que possam minimizar e evitar falhas nas suas aplicações (HADAVI et al., 2017; PRASADH; WONG, 2018).

3.3 Estudo de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade dos materiais foram realizados em duas etapas. A primeira etapa (E_I) ocorreu com os materiais formuladores (QT, HA e Ce-HA) dos *scaffolds* e os SCF-HA e SCF-Ce-HA e tempo de incubação de 24 h. A segunda etapa (E_{II}) ocorreu em dois períodos de incubação celular (24, 48 e 72 h), sendo avaliado somente a citotoxicidade do SCF-Ce-HA. Os resultados do metabolismo celular foram comparados com o controle negativo (α -MEM FBS) (100% de proliferação) e os

grupos foram classificados como sendo (GUO et al., 2012): resultados acima de 80% são considerados não citotóxicos; aqueles entre 80 e 71%, fracamente citotóxicos; aqueles entre 70 e 61%, moderadamente citotóxico; e aqueles abaixo de 60%, fortemente. A Figura 8 mostra os resultados obtidos que foram expressos em densidade ótica (OD)×100% por meio da Equação 2, obtidas por um espectrofotômetro em 550 nm.

Os resultados de viabilidade celular avaliados no E_I mostraram (Figura 9a) que os materiais (QT, HA e Ce-HA) tiveram níveis de viabilidade compatíveis com um efeito não citotóxico (viabilidade celular ≥ 80%). A análise estatística mostrou que os materiais cerâmicos HA e Ce-HA apresentaram níveis de viabilidade celular de 89,0±1,0% e 99,0±3,2%, respectivamente, assim, uma similar ao grupo controle negativo (100%), com significativamente de $p \leq 0,05$, foi observado.

Os pós sintetizados (HA e Ce-HA) não interferiram na atividade metabólica celular e, conseqüentemente, na viabilidade celular e os resultados de viabilidade celular para quitosana também foram positivos para efeitos não citotóxicos. Em outras palavras, os materiais foram classificados como não citotóxicos (inibição menor do que 20% em relação ao grupo controle). Logo, os materiais QT, HA e Ce-HA são não tóxicos. Porém, os *scaffolds* não foram classificados como não citotóxicos (Figura 9a). A viabilidade celular do SCF-Ce-HA foi de 68,0±3,9% e a viabilidade celular para o SCF-HA foi de 46,0±1,7%. Dessa forma, os materiais foram classificados como sendo moderadamente citotóxico e fortemente citotóxico, respectivamente. Esses resultados são referentes ao tempo de incubação de 24 h.

Agora, ao se avaliar os efeitos citotóxicos do material a longo prazo (48 e 72 h) (Figura 9b), os resultados de viabilidade celular para o ensaio no E_{II} mostraram-se muito satisfatórios. Foi observado que o material SCF-Ce-HA, após 72 h de incubação celular, apresentou viabilidade celular de 101,30±2,35% e 110,40±3,87%, respectivamente. Dessa forma, o material SCF-Ce-HA passou a ser classificado como sendo não citotóxicos.

Os resultados do estudo prologado dos efeitos de citotoxicidade do material SCF-Ce-HA mostrou que existiu uma mudança considerável dos efeitos classificados como moderadamente citotóxicos para não citotóxicos (um aumento da proliferação celular próximo a 43%) quando se estendeu o tempo de incubação celular para 72 h.

Acredita-se que o a presença do cério no material tenha causado essa potencialização. Por exemplo, estudos *in vitro* e *in vivo* apontam que existem

respostas positivas dos organismos ao cério, tais quais, fornecimento de propriedades antibacterianas a biomateriais (PRIYADARSHINI et al., 2017; YINGGUANG et al., 2007), auxílio na proliferação, diferenciação e mineralização de osteoblastos e como agente neuroprotetor (ZHOU et al., 2013; RAJESHKUMAR e NAIK, 2018; SCHMIDLIN et al., 2012).

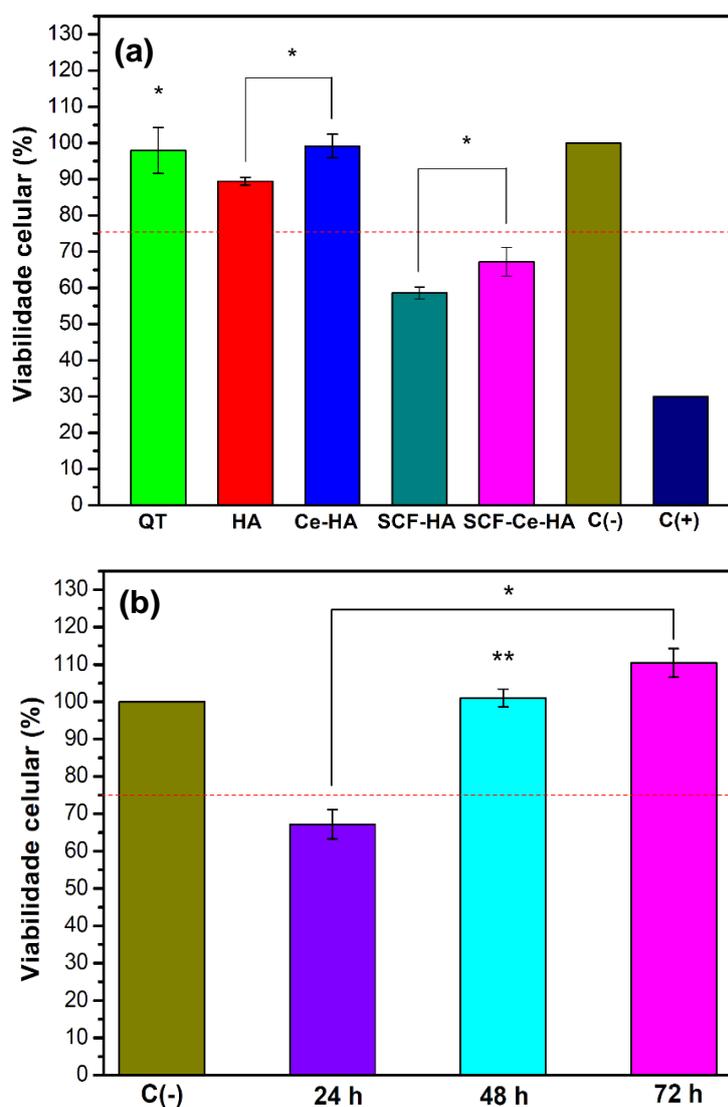


Figura 9. Resultados de proliferação celular *in vitro* para (a) os materiais precursores e suas formulações para o período de 24 h e (b) proliferação celular para o material SCF-Ce-HA em três períodos de tempo. Os resultados são expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle negativo (α -MEM + FBS). Grupo controle positivo como referência de efeito citotóxico (α -MEM + FBS + DMSO). Análise estatística: ANOVA ONE WAY e o teste post-hoc. * $p \leq 0,05$ e **= $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo 72 h.

A presença da HA na formulação do *scaffold* pode ter sido outro fator relevante ao efeito de potencialização da viabilidade celular, uma vez que estudos apontam que essa biocerâmica é amplamente utilizada em aplicações na área da regeneração tecidual e biomédica devido à sua excelente biocompatibilidade, por apresentar propriedade osteocondutora e possuir similaridade com o componente inorgânico do osso natural (LIN et al., 2014; SADAT-SHOJAI et al., 2013; SUPOVÁ, 2015).

Pelo estudo *in vitro* realizado nesse trabalho, os resultados revelaram que a incorporação do íon cério na estrutura da hidroxiapatita, melhorou e potencializou consideravelmente os seus efeitos não citotóxicos. Acredita-se também que a presença do cério possa potencializar os graus de biocompatibilidade do material obtido nesse estudo. Essa afirmativa é dada uma vez que os materiais precursores (QT, HA e Ce-HA) apresentam efeitos não citotóxicos e, ao se comparar a viabilidade entre a HA e a Ce-HA, o material que contém cério apresentou um efeito de viabilidade celular de 10% superior a hidroxiapatita pura. Essa potencialização foi confirmada no tempo final do EII.

Outro fator que pode ter proporcionado esse aumento da viabilidade celular é a presença da QT na formulação do material. O resultado de viabilidade celular para a QT, mostrado na Figura 8a, corrobora e comprova que a QT possui propriedades de citocompatibilidade considerável e que se soma aos efeitos da Ce-HA quando esses materiais estão formulando o compósito QT/Ce-HA. Portanto, o material SCF-Ce-HA foi classificado como sendo não citotóxico após 72 h de incubação celular.

4. CONCLUSÃO

O estudo da incorporação do íon cério, na estrutura da HA, mostrou-se favorável à junção a potencialização das prováveis propriedades de biocompatibilidade. O FTIR e a TG/DTG confirmaram a existência de interação químicas entre a HA e a QT nas formulações dos *scaffolds* formados, assim proporcionando propriedades mecânicas ideais, uma vez que o módulo de Young encontrado foi de 6,07-6,14 MPa e a força máxima de tensão foi de 5,64-5,66 Mpa, com deformação (ϵ) máxima variando entre 91,79-93,22%. Os *scaffolds* apresentaram morfologia porosa. Os poros encontram-se interconectados, de tamanho médio de $244,81 \pm 152,52 \mu\text{m}$ e área de porosidade de $33,34 \pm 8,36\%$. Os resultados do MTT revelaram que a incorporação do cério na estrutura da HA, melhorou

consideravelmente o grau de proliferação celular dos materiais sintetizados. O compósito SCF-Ce-HA foi classificado, após 72 h de tempo de incubação celular, como sendo não citotóxico e pode ser considerado um material ideal para aplicações na área da engenharia tecidual óssea.

5. REFERÊNCIAS

ABUKAWA, H. et al. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: A review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. **Dental Clinics of North America**, v. 50, n. 2, p. 205–216, 2006.

AKTUĞ, S. L. et al. Bioactivity and biocompatibility of hydroxyapatite-based bioceramic coatings on zirconium by plasma electrolytic oxidation. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 1020–1027, 2017.

ALVES, R. et al. Samarium (III) triflate-doped chitosan electrolyte for solid state electrochromic devices. **Electrochimica Acta**, v. 267, p. 51–62, 2018.

ARIFTA, T. I. et al. Fabrication of interconnected porous calcium-deficient hydroxyapatite using the setting reaction of α tricalcium phosphate spherical granules. **Ceramics International**, v. 43, n. 14, p. 11149–11155, 2017.

CABALLERO, S. S. R. et al. Fabrication and characterization of hardystonite-chitosan biocomposite scaffolds. **Ceramics International**, p. 1–11, 2019.

CAZÓN, P. et al. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136–148, 2017.

CHEN, Y. et al. Bioinspired fabrication of carbonated hydroxyapatite/chitosan nanohybrid scaffolds loaded with TWS119 for bone regeneration. **Chemical Engineering Journal**, v. 341, n. January, p. 112–125, 2018.

CHOCHOLATA, P.; KULDA, V.; BABUSKA, V. Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration. **Materials**, v. 12, n. 4, p. 1–25, 2019.

CRUZ, J. B. DA et al. Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásicos. **Revista Matéria**, v. 21, n. 1, p. 129–140, 2016.

DEB, P. et al. Development of bone scaffold using *Puntius conchonus* fish scale derived hydroxyapatite: Physico-mechanical and bioactivity evaluations. **Ceramics International**, v. 45, n. 8, p. 10004–10012, 2019.

DEMIR, A. K.; ELÇIN, A. E.; ELÇIN, Y. M. Strontium-modified chitosan/montmorillonite composites as bone tissue engineering scaffold. **Materials Science and Engineering C**, v. 89, p. 8–14, 2018.

DINESCU, S. et al. In vitro cytocompatibility evaluation of chitosan/graphene oxide 3D scaffold composites designed for bone tissue engineering. **Bio-Medical**

Materials and Engineering, v. 24, n. 6, p. 2249–2256, 2014.

FERREIRA, M. O. G. et al. Chitosan Hydrogel in combination with Nerolidol for healing wounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 409–418, 2016.

FOLLET, H. et al. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: A study on human calcanei. **Bone**, v. 34, n. 5, p. 783–789, 2004.

FRAGAL, E. H. et al. Hybrid materials for bone tissue engineering from biomimetic growth of hydroxiapatite on cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 734–746, 2016.

GRADO, G. F. DE et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. **Journal of Tissue Engineering**, v. 9, p. 1–18, 2018.

GUARESTI, O. et al. Synthesis of stimuli–responsive chitosan–based hydrogels by Diels–Alder cross–linking ‘click’ reaction as potential carriers for drug administration. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, p. 278–286, 2018.

GUO, B. et al. Electroactive porous tubular scaffolds with degradability and non-cytotoxicity for neural tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 144–153, 2012.

HADAVI, M. et al. Novel calcified gum Arabic porous nano-composite scaffold for bone tissue regeneration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 488, n. 4, p. 671–678, 2017.

HE, M. et al. Synthesis of a chitosan-based photo-sensitive hydrogel and its biocompatibility and biodegradability. **Carbohydrate Polymers**, v. 166, p. 228–235, 2017.

HEIDARI, F. et al. Investigation of the mechanical properties and degradability of a modified chitosan-based scaffold. **Materials Chemistry and Physics**, v. 204, p. 187–194, 2018.

IBRAHIM, M. Z. et al. Biomedical materials and techniques to improve the tribological, mechanical and biomedical properties of orthopedic implants – A review article. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 714, p. 636–667, 2017.

JEONG, K. J. et al. In vivo study on the biocompatibility of chitosan-hydroxyapatite film depending on degree of deacetylation. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 105, n. 6, p. 1637–1645, 2017.

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**, v. 226, n. June, p. 132–140, 2017.

KANHED, S. et al. Porosity distribution affecting mechanical and biological behaviour of hydroxyapatite bioceramic composites. **Ceramics International**, v. 43, n. 13, p. 10442–10449, 2017.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339–2349, 2003.

KIM, H. et al. Optimized Zn-doped hydroxyapatite/doxorubicin bioceramics system for efficient drug delivery and tissue engineering application. **Ceramics International**, v. 44, n. 6, p. 6062–6071, 2018.

KOÇ DEMİR, A.; ELÇİN, A. E.; ELÇİN, Y. M. Strontium-modified chitosan/montmorillonite composites as bone tissue engineering scaffold. **Materials Science and Engineering C**, v. 89, n. March, p. 8–14, 2018.

LABATE, G. F. D. et al. Quantifying the micro-architectural similarity of bioceramic scaffolds to bone. **Ceramics International**, v. 43, p. 9443–9450, 2017.

LI, M. et al. An overview of graphene-based hydroxyapatite composites for orthopedic applications. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 1, p. 1–18, 2018.

LI, Z. et al. Preparation and in vitro investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as bone substitute materials. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 3, p. 213–219, 2005.

LIU, Y.; WANG, S.; ZHANG, R. Composite poly(lactic acid)/chitosan nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1130–1137, 2017.

MAJI, K. et al. Preparation and characterization of gelatin-chitosan-nano β -TCP based scaffold for orthopaedic application. **Materials Science and Engineering C**, v. 86, p. 83–94, 2018.

MAJI, S. et al. Development of gelatin/carboxymethyl chitosan/nano-hydroxyapatite composite 3D macroporous scaffold for bone tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 189, p. 115–125, 2018.

MOATARY, A. et al. Design and fabrication of novel chitin hydrogel/chitosan/nano diopside composite scaffolds for tissue engineering. **Ceramics International**, v. 43, p. 1657–1668, 2017.

MONREAL ROMERO, H. A. et al. Synthesis of Hydroxyapatite Nanoparticles in Presence of a Linear Polysaccharide. **Journal of Materials**, v. 2013, p. 1–5, 2013.
O'BRIEN, F. J. et al. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 433–441, 2005.

OH, S. et al. Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 49–56, 2006.

OKADA, M.; MATSUMOTO, T. Synthesis and modification of apatite nanoparticles

for use in dental and medical applications. **Japanese Dental Science Review**, v. 51, n. 4, p. 85–95, 2015.

ORYAN, A. et al. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 678–688, 2018.

OSÓRIO, L. R. et al. Evaluation of physico-chemical properties and antimicrobial synergic effect of ceftazidime-modified chitosan. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, n. 3, p. 1629–1636, 2018.

PRASADH, S.; WONG, R. C. W. Unraveling the mechanical strength of biomaterials used as a bone scaffold in oral and maxillofacial defects. **Oral Science International**, v. 15, n. 2, p. 48–55, 2018.

PRECHEUR, H. V. Bone Graft Materials. **Dental Clinics of North America**, v. 51, n. 3, p. 729–746, 2007.

RADHAKUMARY, C.; ANTONY, M.; SREENIVASAN, K. Drug loaded thermoresponsive and cytocompatible chitosan based hydrogel as a potential wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 705–713, 2011.

RAINA, D. B. et al. Biocomposite macroporous cryogels as potential carrier scaffolds for bone active agents augmenting bone regeneration. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 365–378, 2016.

REN, Y. et al. Rapid coating of AZ31 magnesium alloy with calcium deficient hydroxyapatite using microwave energy. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 364–372, 2015.

REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, 2006.

RIBAS, R. G. et al. Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review. **Ceramics International**, p. 1–11, 2019.

RIBEIRO, M. et al. Development of silk fibroin/nanohydroxyapatite composite hydrogels for bone tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 66–77, 2015.

SALIMI, M. N.; ANUAR, A. Characterizations of biocompatible and bioactive hydroxyapatite particles. **Procedia Engineering**, v. 53, p. 192–196, 2013.

SANTOS, M. V. B. DOS et al. Development of Composite Scaffolds Based on Cerium Doped-Hydroxyapatite and Natural Gums—Biological and Mechanical Properties. **Materials**, v. 12, p. 1–21, 2019.

SANTOS, M. V. B. DOS; OSAJIMA, J. A.; DA SILVA FILHO, E. C. Hidroxiapatita: suporte para liberação de fármacos e propriedades antimicrobianas. **Cerâmica**, v. 62, p. 256–265, 2010.

SARAVANAN, S.; LEENA, R. S.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1354–1365, 2016.

SEKINE, Y. et al. Calcium-deficient hydroxyapatite as a potential sorbent for strontium. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

SENTHILKUMAR, R. P. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of hybrid chitosan-cerium oxide nanoparticles: As a bionanomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1746–1752, 2017.

SHAKIR, M. et al. Synthesis and characterization of a nano-hydroxyapatite/chitosan/polyethylene glycol nanocomposite for bone tissue engineering. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 26, n. 1, p. 41–48, 2015.

SHAKIR, M. et al. Synthesis, characterization and in vitro screening of a nano-hydroxyapatite/chitosan/ Euryale ferox nanoensemble-an inimitable approach for bone tissue engineering. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 363–371, 2018.

SHAMEKHI, M. A. et al. Fabrication and characterization of hydrothermal cross-linked chitosan porous scaffolds for cartilage tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 532–542, 2017.

SHAVANDI, A. et al. Bio-scaffolds produced from irradiated squid pen and crab chitosan with hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate for bone-tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1446–1456, 2016.

SOBCZAK-KUPIEC, A. et al. Effect of calcination parameters on behavior of bone hydroxyapatite in artificial saliva and its biosafety. **Materials Chemistry and Physics**, v. 206, p. 158–165, 2018.

TAKTAK, R. et al. Tricalcium phosphate-Fluorapatite as bone tissue engineering: Evaluation of bioactivity and biocompatibility. **Materials Science and Engineering C**, v. 86, p. 121–128, 2018.

TAVARES, D. DOS S. et al. Incorporation of strontium up to 5 Mol. (%) to hydroxyapatite did not affect its cytocompatibility. **Materials Research**, v. 14, n. 4, p. 456–460, 2011.

TSIOURVAS, D.; SAPALIDIS, A.; PAPADOPOULOS, T. Hydroxyapatite/chitosan-based porous three-dimensional scaffolds with complex geometries. **Materials Today Communications**, v. 7, p. 59–66, 2016.

VENKATESAN, J.; KIM, S. K. Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview. **Marine Drugs**, v. 8, n. 8, p. 2252–2266, 2010.

VLADESCU, A. et al. Mechanical properties and biocompatibility of the sputtered Ti doped hydroxyapatite. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 63, p. 314–325, 2016.

XU, Y. et al. Design and fabrication of a chitosan hydrogel with gradient structures via a step-by-step cross-linking process. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 195–202, 2017.

YANG, J. et al. Fabrication of a chitosan/bioglass three-dimensional porous scaffold for bone tissue engineering applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 20, n. 38, p. 6611–6618, 2014.

YANG, Y. C. et al. Flame sprayed zinc doped hydroxyapatite coating with antibacterial and biocompatible properties. **Ceramics International**, v. 43, p. S829–S835, 2017.

ZHANG, Z. Z. et al. Role of scaffold mean pore size in meniscus regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 43, p. 314–326, 2016.

ZHAO, H.; LIANG, W. A novel comby scaffold with improved mechanical strength for bone tissue engineering. **Materials Letters**, v. 194, p. 220–223, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É sabido que a hidroxiapatita é amplamente utilizada em aplicações na área da regeneração tecidual e biomédica na forma de revestimentos sobre implantes ou próteses e em materiais para produção de enxertos ósseo. Logo, o presente trabalho se propôs a desenvolver biocompósitos que futuramente possam vir a ser utilizados como biomateriais ou componentes formuladores desses. Espera-se que as propriedades investigadas nesse estudo, proporcionem aos organismos implantados ou em suas futuras formulações contendo esses biomateriais, características que propiciem uma alta taxa de aceitação e recuperação pós-cirúrgica, uma rápida cicatrização das lesões teciduais e baixas taxas de rejeição e infecção, devido à uma provável biocompatibilidade elevada, assim como, a potencialização do crescimento celular e mecanismos de ação de combate contra bactérias, uma vez que essas duas últimas propriedades foram constatada ao longo desse estudo. Além do mais, os métodos de sínteses se mostraram de fácil execução, de baixo custo e com uma alta eficiência, o que se levou as buscas na literatura, tais quais, artigos científicos, depósitos de patentes, sínteses dos materiais, caracterizações e testes de algumas propriedades biológicas *in vitro*, proporcionaram ao autor e aos demais colaboradores o desenvolvimento de uma patente de inovação tecnológica. Logo, a composição de hidroxiapatita dopada com metais com propriedades antibacterianas para aplicações como materiais de preenchimento ósseo e suas formulações como biocompósitos podem ser classificados como potenciais materiais a serem aplicados na área da engenharia tecidual óssea.

PESPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Avaliação *in vivo* dos biomateriais se mostra ser uma alternativa promissora para constatar os resultados obtidos pelos ensaios *in vitro*.
- ✓ Poderão ser feitas novas sínteses contendo combinações de dopantes na estrutura da hidroxiapatita.
- ✓ A associação desses biomateriais para formulações de biohidrogéis baseado em hidroxiapatita, polissacarídeos e o ácido hialurônico pode ser uma alternativa voltada para utilizações em tratamento de doenças articulares como a artrite e as osteoartrite.
- ✓ A produção de novos biomateriais na forma de *scaffold* a partir dos biocompósitos com moléculas biologicamente ativas como a proteína morfogenética óssea (BMP - *Bone Morphogenetic Proteins*) parece ser algo promissor para aplicações na área da engenharia tecidual óssea.

ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550-Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Universidade Federal do Piauí, através do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI – NINTEC –, efetuou às 18:02 horas do dia 14/05/2018, sob o número de Protocolo do INPI: 870180040148 o depósito de Pedido de Patente de Invenção intitulado **“COMPOSIÇÃO DE HIDROXIAPATITA DOPADA COM METAIS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS PARA APLICAÇÕES COMO MATERIAIS DE PREENCHIMENTO ÓSSEO”**, com o número **BR 10 2018 009777-6**, desenvolvida pelos inventores:

EDSON CAVALCANTI DA SILVA FILHO
 EWERTON GOMES VIEIRA
 MARCOS PEREIRA DA SILVA
 THÁTILA WANESSA VIEIRA DE SOUSA
 JOSY ANTEVELI OSAJIMA FURTINI
 CARLA ADRIANA RODRIGUES DE SOUSA BRITO
 MARIA LARA CRISTINA SANTOS DE MACEDO
 RICARDO BARBOSA DE SOUSA

Teresina, 29 de janeiro de 2019.

Profa. Dra. Maria Rita de Moraes Chaves Santos

Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia