



COPPE/UFRJ

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE HIDROXIAPATITA CONTENDO SILÍCIO SOB
CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA**

Helena Marques da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadoras: Gloria de Almeida Soares
Karine Anselme

Rio de Janeiro
Agosto de 2009

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE HIDROXIAPATITA CONTENDO SILÍCIO SOB
CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA

Helena Marques da Silva

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Prof^a. Gloria de Almeida Soares, D. Sc.

Dra. Karine Anselme, Ph.D.

Prof. Celso Aparecido Bertran, D.Sc.

Dra. Elena Mavropoulos Oliveira Tude, D.Sc.

Prof^a. Renata Antoun Simão, D. Sc

Prof^a. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

AGOSTO DE 2009

Silva, Helena Marques da

Avaliação In Vitro de Hidroxiapatita Contendo Silício sob Condições Estática e Dinâmica/ Helena Marques da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2009.

XII, 85 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadoras: Gloria de Almeida Soares

Karine Anselme

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2009.

Referencias Bibliográficas: p. 78-85.

1. Hidroxiapatita 2. Silício 3. Superfície 4. Osteoblastos 5. Biorreator. I. Soares, Gloria de Almeida et al. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

*“Quand je compare les variation du temps
aux variations de notre état d’âme et
de nos conditions de vie,
je garde un peu d'espoir:
cela finira peut-être mieux que nous ne le pensons.”*

Vincent Van Gogh

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma etapa realizada em minha vida.

À mamãe, Vera Lúcia, por todo incentivo, amor, carinho e por ser meu porto seguro.

Às minhas orientadoras, Prof. Glória Soares e Dra Karine Anselme, pela confiança e oportunidade para desenvolver o presente trabalho. Em especial à Prof. Glória, por todo ensinamento, dedicação, paciência e pelo exemplo de vida.

Aos meus amigos que incondicionalmente me deram força para realização desta tese, e como já dizia o poeta: *“Quando eu fico triste, o samba insiste em me levar.... Boa companhia faz o dia clarear, amizade é o melhor remédio...”*

Ao meu melhor amigo e namorado, que muito me incentivou, teve paciência e me deu muito amor e carinho, Laurent Knopf.

Aos amigos do laboratório de Biomaterias do PEMM, por todos os estudos, discussões e grande auxílio na realização e interpretação dos experimentos. Em especial às amigas Márcia Sader, Cristiane Xavier e Doris Campos por todo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos funcionários do PEMM que de forma direta e indireta auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos colegas e funcionários do IS2M de Mulhouse, em especial a pós doc Mihaela Mateescu, que participou de grande parte deste trabalho. Agradeço também às pessoas do SPCTS de Limoges, pela oportunidade e acolhimento em seus laboratórios.

Aos amigos que muito me apoiaram durante estadia na França e fizeram com que meus dias fossem ainda melhores: Maria Fernanda, Bartira, Eliane Maria, Fernanda, Gosia, Ana Paula, Euler, Laurent Vonna, Patricia Davidson, Judith, Philippe Bernardaud, Jean Christophe, Natalina, Sepie e Nathalie. *Voilà, je vous remercie de tout mon coeur.*

Às agências de fomento, CNPq, CAPES, FAPERJ, CNRS-França, pelo suporte financeiro.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE HIDROXIAPATITA CONTENDO SILÍCIO SOB
CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA

Helena Marques da Silva

Agosto/2009

Orientadoras: Glória de Almeida Soares

Karine Anselme

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Um estudo comparativo de bioatividade *in vitro* de hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita substituída com silício (SiHA) foi realizado a partir da imersão em meio de cultura celular na presença e ausência de soro fetal bovino por 14 dias sob condições estática e dinâmica. Um biorreator foi usado para os experimentos sob condição dinâmica. Transformações de superfícies foram caracterizadas por microscopia de força atômica e espectroscopia de foto-elétrons de raios-X antes e após imersão. Foi realizado o monitoramento de cálcio, fósforo e proteína no meio de cultura. A morfologia, proliferação e diferenciação de osteoblastos humanos (SaOs2) cultivados sobre as superfícies cerâmica foram avaliadas sob condições estática e dinâmica por 1, 3 e 8 dias. As duas superfícies de hidroxiapatita imersas no meio de cultura sob condição dinâmica apresentaram precipitados de hidroxiapatita cálcio-deficiente contendo Mg. Além disso, superfície de SiHA apresentou uma maior capacidade de adsorção de proteínas. A avaliação celular demonstrou que o silício, presente na estrutura da hidroxiapatita, é responsável por estimular a diferenciação celular, medida por atividade de fosfatase alcalina. A cultura celular sob condição dinâmica resultou em diferenças mais marcantes em função da química da superfície.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

IN VITRO EVALUATION OF SILICON-CONTAINING HYDROXYAPATITE
CONTAINING SILICON UNDER STATIC AND DYNAMIC CONDITIONS

Helena Marques da Silva

August/2009

Advisors: Glória de Almeida Soares

Karine Anselme

Department: Metallurgical and Material Engineering

A comparative study of *in vitro* bioactivity of hydroxyapatite (HA) and silicon doped hydroxyapatite (SiHA) has been carried out by immersion in a cell culture medium with or without fetal bovine serum during 14 days in static and dynamic conditions. A specific bioreactor was used for the experiments in dynamic conditions. Ceramic surface transformations were characterized by electron microscopy, atomic force microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy before and after immersion. The monitoring of calcium, phosphate and proteins in immersion medium was also done during the experiment. The morphology, proliferation and differentiation of human osteoblastic (SaOs2) on the ceramics surfaces was carried out under static and dynamic conditions for 1, 3 and 8 days. The two hydroxyapatite surfaces immersed in cell culture medium under dynamic conditions were found to be more probably covered by a new Mg enriched Ca-deficient apatite layer than surfaces immersed under static conditions. Moreover, SiHA presented a higher capacity of protein adsorption. The cell evaluation demonstrated that the silicon present in hydroxyapatite structure is responsible for stimulating cell differentiation, measured by alkaline phosphatase. Cell culture under dynamic condition resulted in more significant differences in function of surface chemistry.

Sumário

I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
II.1- FOSFATO DE CALCIO.....	3
<i>II.1.1 - HIDROXIAPATITA ESTEQUIOMÉTRICA</i>	<i>4</i>
II. 2 – ESTUDO BIOMIMETICO	9
<i>II.2.1 – Biorreator</i>	<i>10</i>
II.3 - ADSORÇÃO DE PROTEINAS	11
II.4 - ADESÃO CELULAR	13
<i>II.4.1 - Proteínas envolvidas na adesão celular.....</i>	<i>14</i>
II.5 - DIFERENCIAÇÃO	15
II.6 - OSTEOLASTOS.....	15
<i>II.6.1 - CULTURA DE CÉLULAS IN VITRO</i>	<i>17</i>
III. OBJETIVOS	19
III.1. GERAIS.....	19
III.2. ESPECÍFICOS	19
IV. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	20
IV.1. OBTENÇÃO DAS HIDROXIAPATITAS PURA E SUBSTITUÍDA COM Si	20
<i>IV.1.1. Síntese dos pós</i>	<i>20</i>
<i>IV.1.2. Produção de pastilhas.....</i>	<i>23</i>
IV.1.3. SINTERIZAÇÃO.....	23
IV.2. CARACTERIZAÇÃO DAS PASTILHAS	24
IV.2.1. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	24
<i>IV.2.2. Composição das pastilhas.....</i>	<i>24</i>
<i>IV.2.3. Energia de superfície</i>	<i>25</i>
IV.3.1. ESTUDO BIOMIMÉTICO SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA....	26
<i>IV.3.1.1. Caracterização de superfícies</i>	<i>28</i>
<i>IV.3.1.2. Análise do meio de cultura</i>	<i>28</i>
IV.3.2. AVALIAÇÃO CELULAR SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA	29
<i>IV.3.2.1. Cultura de osteoblastos.....</i>	<i>29</i>
<i>IV.3.2.2. Avaliações celulares qualitativas</i>	<i>30</i>
<i>IV.3.2.3. Avaliações celulares quantitativas.....</i>	<i>31</i>
IV.3.2.3.1. Proliferação celular e teste de citotoxicidade.....	31

IV.3.2.3.2. Proliferação celular (atividade ALP).....	32
IV.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
V. 1. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CERAMICAS	34
V.2. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	39
V.2.1. ESTUDO BIOMIMÉTICO.....	39
V.2.1.1. Concentração de cálcio e fosfato nos meios de imersão.....	39
V.2.1.2. Concentração de proteína.....	46
V.2.1.3. Análise de superfície após imersão.....	47
V.2.1.4. Química de superfície	52
V.2.2 – CULTURA DE CÉLULAS	57
V.2.2.1 – Cultura de células sob condição estática	57
(a) Adesão Celular	57
(b) Espraiamento celular	58
(c) Formação de contatos focais e fibras de tensão	58
(d) Morfologia Celular	62
(e) Atividade celular – MTT	64
(f) Diferenciação celular (atividade de fosfatase alcalina)	64
V.2.2.2 – Cultura de células sob condição dinâmica.....	67
(a) Atividade celular – MTT	67
(b) Diferenciação celular (atividade de fosfatase alcalina)	68
(c) Formação de contatos focais e fibras de tensão	69
VI. CONCLUSÕES	75
VII. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

Lista de Figuras

Figura IV. 1 - Diagrama esquemático do procedimento experimental.....	20
Figura IV. 2 - Diagrama esquemático do sistema do biorreator sob temperatura constante (37°C). Um tubo de silicone (3) faz a conexão entre o novo meio de cultura contido na garrafa (1) (acoplada a um filtro de ar (2)), a câmara contendo as amostras (5) e garrafa de recolhimento do meio (6). Uma bomba peristáltica (4) disposta antes da câmara mantém o fluxo do fluido constante à 2mL/h. Duas amostras (7) foram usadas para cada experimento, ficando permanentemente em contato com o meio, sob fluxo constante.....	27
Figura V. 1 - Micrografia das superfícies de (a) HA e (b) SiHA após sinterização à 1200°C/1h e antes do polimento das amostras.....	35
Figura V. 2 - Perfis 3D típicos das superfícies polidas de (a) HA e (b) SiHA obtidos por AFM em modo de contato intermitente.....	35
Figura V. 3 - Espectros de DRX dos pós de HA e SiHA sinterizados a 1200°C.	36
Figura V. 4 - EDS dos pós das hidroxiapatitas (a) pura e (b) substituída com Si.....	36
Figura V. 5 - Espectroscopia dos pós das hidroxiapatitas pura e substituída com Si. .	37
Figura V. 6 - Energias de superfície total γ , dispersiva γ^D e polar γ^P para HA e SiHA. Diferença significativa de γ^P entre valores referentes à HA e SiHA (*).	38
Figura V. 7 - Concentração de cálcio sob condições estática e dinâmica para HA em (a) MNC e (b) MC.	40
Figura V. 8 – Concentração de cálcio sob condições estática e dinâmica para SiHA em (a) MNC e (b) MC.	41
Figura V. 9 - Concentração de fosfato nos meios (a) não completo e (b) completo após imersão de HA.	43
Figura V. 10 - Concentração de fosfato nos meios (a) não completo e (b) completo após imersão de SiHA.	45
Figura V. 11 - Dosagem de proteínas adsorvidas na superfícies de HA e SiHA imersas em meio de cultura completo sob condições estática e dinâmica.....	47
Figura V. 12 - Micrografias das superfícies de HA imersas em meio não completo (MNC) sob condições estática e dinâmica.	48
Figura V. 13 - Micrografias das superfícies de SiHA imersas em meio não completo (MNC) sob condições estática e dinâmica.	49
Figura V. 14 - Micrografias das superfícies de HA imersas em meio completo (MC) sob condições estática e dinâmica.....	49

Figura V. 15 - Micrografias das superfícies de SiHA imersas em meio completo (MC) sob condições estática e dinâmica.	50
Figura V. 16 - Micrografias obtidas por AFM de SiHA imersas em (a) em meio não completo e (b) completo sob condição estática por 3 dias, escalas iguais (10 μm x 10 μm).	51
Figura V. 17 – Rugosidade medida por AFM após 3 dias de imersão em meio não completo (MNC) e meio completo (MC) sob condições estática (est) e dinâmica (din). * e °, representam diferença significativa em comparação às amostras polidas para HA e SiHA, respectivamente, $p < 0,05$	52
Figura V. 18 - Razão Ca/P das superfícies de HA e SiHA imersas em meio não completo sob condições estática e dinâmica.	53
Figura V. 19 - Razão Ca/P das superfícies de HA e SiHA imersas em meio completo sob condições estática e dinâmica.	54
Figura V. 20 - Eficiência da adesão correspondente à razão entre o número de células aderidas sobre as amostras após 4h e o número de células aderidas sobre o controle.	57
Figura V. 21 - Espreadimento celular sobre superfícies HA e SiHA após 24 horas de cultivo.....	58
Figura V. 22 - Imunomarcagem da vinculina nas células cultivadas sobre as superfícies de HA e SiHA após 3 dias	59
Figura V. 23 - Aglomerados de vinculina nas células cultivadas por 3 dias sobre superfícies de HA e SiHA.	60
Figura V. 24 - Marcação do DNA, apresentando o núcleo em azul, e F-actina por faloidina-FITC (verde) nas células cultivadas por 3 dias sobre as superfícies HA e SiHA.....	61
Figura V. 25 - Área média celular sobre as superfícies de HA, SiHA e controle (Thermanox) para 1 e 3 dias de cultivo.	62
Figura V. 26 - Micrografias obtidas por MEV das células cultivadas sobre as superfícies HA, SiHA e controle por 3 dias.....	63
Figura V. 27 - Perfil de crescimento das células SaOs2 ao longo do tempo sobre as superfícies controle, HA e SiHA. Diferenças significativas para um mesmo tempo de cultivo das superfícies cerâmicas em relação ao controle (*). Diferença significativa para um mesmo tempo de cultivo entre as superfícies cerâmicas (@).....	64
Figura V. 28 - Nível percentual de fosfatase alcalina por célula após 8 dias de cultivo sobre as superfícies HA, SiHA em relação ao controle (Thermanox). Diferenças significativas em comparação ao controle (*).	65

Figura V. 29 - Perfil de crescimento das células SaOs2 ao longo do tempo sobre as superfícies HA e SiHA sob condições estática e dinâmica.	68
Figura V. 30 – Número de mols de fosfatase alcalina por célula após 8 dias de cultivo sobre as superfícies HA e SiHA sob condições estática e dinâmica.....	69
Figura V. 31 - Imunomarcacão da vinculina nas células cultivadas sobre as superfícies SiHA após 3 dias de cultivo sob condições (a) estática e (b) dinâmica.	70
Figura V. 32 - Aglomerados de vinculina nas células cultivadas por 3 dias sobre de SiHA sob condições estática e dinâmica.....	71
Figura V. 33 - Marcação do DNA, apresentando o núcleo em azul, e F-actina por faloidina-TRIC (vermelho) nas células cultivadas por 3 dias sobre as superfícies SiHA sob condições estática e dinâmica	72
Figura V. 34 - Área média celular sobre as superfícies SiHA sob condições estática e dinâmica para 1 e 3 dias de cultivo.	73

Lista de Tabelas

Tabela II. 1 – Exemplos de substituições na estrutura da apatita.	6
Tabela II. 2 – Sínteses de hidroxiapatita substituída por Si.....	8
Tabela II. 3 - Concentração iônica do plasma sanguíneo (Chou <i>et al.</i> , 2004).....	9
Tabela IV. 1 - Número de mols utilizados para síntese de SiHA.....	21
Tabela IV. 2- Valores da área de superfície para os pós de HA e SiHA antes e após calcinação.....	23
Tabela IV. 3– Valores das tensões superficiais total, dispersiva e polar dos líquidos usados nesse estudo.....	26
Tabela V. 1 – Variação do magnésio sobre as superfícies de HA e SiHA obtida por XPS e EDS em função das condições experimentais após 3 dias de imersão em meios completo e não completo.	54
Tabela V. 2 – Resumo dos resultados de HA e SiHA sob condições estática e dinâmica, MNC: meio não completo, MC: meio completo, NA: não aplicável. . =, +, -, +/-: mudanças em concentração no meio de imersão em comparação à concentração inicial ou mudança em Ra (rugosidade) ou quantidade de Mg nas superfícies em comparação com a superfície controle.....	56
Tabela V. 3- Resposta celular para cultura estática sobre superfícies de HA e SiHA.	66

I. INTRODUÇÃO

O esqueleto de um adulto se renova constantemente na ordem de 10% ao ano. Essa remodelagem óssea é necessária para conservação das propriedades mecânicas dos ossos e da cicatrização, em casos de fratura. No entanto, em algumas situações a remodelagem óssea não é suficiente no caso de patologias como câncer ósseo, patologias genéticas ou lesões casudas por acidentes de maior porte. Portanto, nesses casos justifica-se a utilização dos biomateriais cerâmicos, particularmente os fosfatos de cálcio.

Dentre os fosfatos de cálcio, as cerâmicas à base de hidroxiapatita ou de β fosfato tricálcico são as mais empregadas em aplicações clínicas, como enxertos ósseos e em arcabouços para a engenharia de tecidos. A hidroxiapatita estequiométrica apresenta uma baixa solubilidade em meios biológicos, fazendo com que sua aplicação seja prejudicada quando se necessita uma rápida osseointegração. Uma das maneiras de se melhorar sua bioatividade seria a elaboração de apatitas substituídas com íons presentes na apatita da fase mineral dos ossos (GIBSON *et al.*, 2000)

As substituições iônicas podem afetar a química e a estrutura da superfície da hidroxiapatita, influenciando assim o comportamento do material quando em contato com o meio biológico. Trabalhos encontrados na literatura revelam numerosas substituições iônicas na estrutura da apatita, sendo a substituição do silício (Si), uma das mais recentes. O elemento Si representa 0,05% da massa corporal, sendo localizado no osteóide (osso primário ou embrionário), assumindo assim um papel importante na formação óssea e na calcificação.

Vários parâmetros de superfície e biológicos estão envolvidos nas interações célula/biomateriais. O contato inicial das células, osteoblastos, com superfícies de implante via receptores específicos e integrinas é o evento de adesão para células

ósseas que influencia a osseointegração dos implantes. A otimização topográfica e química das superfícies pode facilitar a adesão e diferenciação das células e promover a deposição de nova matriz óssea sobre o implante (ANSELME & BIGERELLE, 2006a).

Quando entra em contato com o plasma sanguíneo, a maior parte dos biomateriais tende a ser recoberto por uma camada de proteínas, sendo essa modificação inicial de superfície a responsável, em grande medida, pelo comportamento desses biomateriais. Logo, ressalta-se a importância do estudo das superfícies em contato com o fluido corpóreo simulado contendo tanto a parte inorgânica quanto orgânica.

Pesquisas recentes apresentam um melhor entendimento biológico quando o trabalho *in vitro* é realizado em meios dinâmicos, ou seja, um fluxo constante de fluido corpóreo promove uma tensão cizalhante sobre a superfície e um enriquecimento de transporte de massa. Para isso, utiliza-se um biorreator que mimetiza a condição real do corpo, levando em consideração controles do fluxo, pH e temperatura.

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação biológica sob condição estática e dinâmica das hidroxiapatitas estequiométrica e substituída com silício, produzidas por precipitação por via úmida. Um estudo biomimético foi realizado visando compreender as transformações superficiais das cerâmicas quando imersas em meio de cultura celular. O comportamento de células osteoblásticas foi monitorado a partir de teste de citotoxicidade e técnicas de microscopia. A influência topográfica foi eliminada fazendo-se o polimento de todas as amostras estudadas, logo foi possível avaliar apenas a influência química nas respostas biológicas.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1- FOSFATO DE CALCIO

Dentre os fosfatos de cálcio, as cerâmicas de apatita são as mais estudadas na área biomédica. Apatita é o nome de uma vasta série de minerais isomorfos. O nome *apatites*, do grego, enganadora, justifica as dificuldades envolvidas na sua identificação devido à sua falta de estequiometria (AOKI, 1991).

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as biocerâmicas por não apresentarem toxicidade local ou sistêmica, ou seja, serem biocompatíveis, pela ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações, e aparente habilidade em interagir com o tecido hospedeiro. Tais vantagens podem ser explicadas pela natureza química destes materiais, que por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica (Kawachi, 2000).

Os compostos à base de fosfato de cálcio denominados apatita, particularmente a hidroxiapatita sintética, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, são amplamente empregados nas áreas médicas e odontológicas por apresentarem excelente biocompatibilidade proporcionada pela sua similaridade química, biológica e cristalográfica com a fase mineral do tecido ósseo (CAMPBELL, 2003).

Os fosfatos de cálcio mais utilizados são β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ β), hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ou uma mistura bifásica de β -TCP e HA em uma proporção variável de acordo com as propriedades desejadas (LEGEROS, 1993; HENCH, 1998).

A solubilidade dos fosfatos de cálcio aumenta à medida que a razão Ca/P (razão entre número de átomos de cálcio e número de átomos de fósforo presentes na estrutura de cada fosfato) diminui. Em geral, essa razão varia entre 0,5 e 2,0 sendo que, quanto menor seu valor, maior sua acidez e solubilidade em água. Desta forma, a

hidroxiapatita estequiométrica, razão molar Ca/P igual a 1,67, é pouco solúvel em meios biológicos

II.1.1 - HIDROXIAPATITA ESTEQUIOMÉTRICA

Em 1926, estudos de difração de raios-X e análise química observaram a semelhança da fase mineral da dentina, esmalte e osso com hidroxiapatita (HA). Entretanto a fase mineral do tecido ósseo não possui uma composição bem definida, além de apresentar variações durante estágios de maturação e envelhecimento dos tecidos duros. Sendo assim, a maior diferença entre HA sintética e apatita óssea está na cristalinidade e na quantidade de íons substituintes (KAY, 1992; KAWACHI et al., 2000).

A hidroxiapatita cristaliza-se no sistema hexagonal, grupo espacial $P6_3/m$ e dimensões de célula unitária $a=b=9,42 \text{ \AA}$ e $c=6,88 \text{ \AA}$ (Aoki, 1991).

A célula unitária hexagonal da hidroxiapatita contém 10 íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I (Ca_I) e seis no sítio II (Ca_{II}). Os íons cálcio no sítio I estão alinhados em colunas, enquanto os íons cálcio do sítio II estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da estrutura. Os cátions do sítio I estão coordenados a 6 átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de PO_4 e também a 3 outros átomos de oxigênio relativamente distantes (Aoki, 1991).

Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria. Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons óxidos (O^{2-}) e de íons cálcio (Ca^{2+}) estão ligados entre si por íons fosfato. Os átomos de oxigênio dos íons hidroxila estão situados a $0,9 \text{ \AA}$ abaixo do plano formado pelos triângulos de cálcio e a ligação O-H forma um ângulo de aproximadamente 30° com a direção C . Dos quatro átomos de

oxigênio que constituem os grupos fosfatos, dois estão situados em planos perpendiculares à direção c e os outros dois são paralelos a esta direção (Aoki, 1991).

II.1.1.1 - Substituições na estrutura da apatita

Mesmo que a composição química de alguns fosfatos de cálcio se aproxime das apatitas biológicas, a bioatividade desses materiais artificiais fica relativamente limitada (HENCH, 1998). Uma maneira de melhorar suas propriedades biológicas seria ajustar sua composição próxima a dos ossos, via substituição na estrutura da apatita (VALLET-REGI & ARCOS, 2005).

Uma variedade de substituintes pode ser facilmente incorporada na estrutura da HA, induzindo assim modificações na cristalinidade, morfologia, parâmetros de rede e estabilidade térmica. Cada agrupamento iônico da apatita pode ser substituído por outro agrupamento iônico de mesma valência ou de valência diferente. Alguns exemplos de substituições são apresentados na Tabela II.1, sendo esses elementos relacionados aos presentes na estrutura da fase mineral do osso. Os sítios de hidróxido (OH^-) e fosfato (PO_4^{3-}) da HA são notados, respectivamente, como sítios A e B (PALARD *et al.*, 2008).

A introdução de novos grupamentos iônicos na estrutura da apatita leva a uma diminuição de cristalinidade e da estabilidade térmica e a um aumento da solubilidade. Estas apatitas apresentadas atendem a essa regra, com exceção para os íons flúor (F^-) que substituem os íons (OH^-), pois essa substituição tende a reduzir a solubilidade do material (YAO *et al.*, 2009).

Dentre os substituintes catiônicos, o magnésio é o mais estudado, sendo o quarto cátion mais abundante no osso humano (0,44 – 1,23% massa). Diversos trabalhos mostram que o magnésio está associado com a mineralização de tecidos calcificados, estimulando diretamente a proliferação de osteoblastos. Além disso, foi mostrado que a presença do Mg^{2+} na estrutura da HA afeta sensivelmente a sua

cristalização, desestabilizando sua estrutura e favorecendo a formação de β TCP (CACCIOTTI *et al.*, 2009).

Tabela II. 1 – Exemplos de substituições na estrutura da apatita.

<i>Substituições</i>	<i>Fórmulas químicas teóricas</i>
Sítio Ca⁺²	
Mg ⁺²	Ca _{10-x} Mg _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Zn ⁺²	Ca _{10-x} Zn _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Sr ⁺²	Ca _{10-x} Sr _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Ag ⁺	Ca _{10-x} Ag _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Sítio B (PO₄⁻³)	
CO ₃ ⁻²	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (CO ₃) _x (OH) _{2-x}
SiO ₄ ⁻⁴	Ca ₁₀ (PO ₄) _{6-x} (SiO ₄) _x (OH) _{2-x}
HPO ₄ ⁻²	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (HPO ₄) _x (OH) _{2-x}
Sítio A (OH⁻)	
F ⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} F _{2x}
Cl ⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} Cl _{2x}
CO ₃ ⁻²	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} (CO ₃) _x

O zinco (Zn⁺²), conhecido como bioelemento, está presente nos ossos em 0,0126 a 0,0217% em massa (TAMM & PELD, 2006). A presença de Zn na apatita diminui a reação de inflamação induzida pela fagocitose dos pós de HA (GRANDJEAN-LAQUERRIERE *et al.*, 2006). Além disso, o Zn estimula o crescimento e a mineralização óssea (HASHIZUME & YAMAGUCHI, 1993; KISHI & YAMAGUCHI, 1994). Estudos realizados por Jallot e colaboradores mostraram que a bioatividade da HA contendo 0,5% em massa de Zn (x=0,78) é superior à da HA pura (JALLOT *et al.*, 2005).

O estrôncio (Sr) é usualmente encontrado em regiões onde a renovação metabólica é importante. Esse elemento tem um efeito benéfico no tratamento de osteoporose (BIGI *et al.*, 2007). A presença do Sr aumenta o número de osteoblastos e diminui o número e atividade dos osteoclastos (redução da ressorção óssea) (CANALIS *et al.*, 1996).

As apatitas substituídas por prata (Ag) possuem um efeito anti-bactericida, sendo importante, já que proteínas e outros componente orgânicos são facilmente adsorvidos à superfície de HA, favorecendo a reprodução de bactérias. Logo, HA dopada com uma pequena quantidade de Ag minimiza os riscos de contaminação bacteriana sem comprometer a bioatividade do material (RAMESHBABU *et al.*, 2007).

Com baixa quantidade na estrutura da apatita, o flúor (F) pode agir no ambiente celular, aumentando a formação óssea. Enquanto que a importância do cloro (Cl) na estrutura da apatita reside na capacidade de desenvolver um ambiente ácido na superfície dos ossos, ativando os osteoclastos na ressorção óssea. Além disso, o cloro ativa a ação das enzimas ácidas secretadas pelos osteoclastos que digerem a matriz orgânica. (KANNAN *et al.*, 2006; KANNAN *et al.*, 2007).

Os íons carbonato (CO_3^{2-}) permitem dois tipos de substituição na estrutura da apatita. Sendo do tipo B, por íons fosfato (PO_4^{3-}), ou do tipo A por hidroxila (OH^-) (ELLIOT, 1984). Estudos demonstram que o carbonato substituído na estrutura da apatita é responsável pelo aumento da solubilidade e da bioatividade da hidroxiapatita (GIBSON *et al.*, 1999; HANKERMEYER *et al.*, 2002). Landi e colaboradores mostraram, por meio de testes in vivo, que HA carbonatada apresenta uma boa compatibilidade, boa osteointegração e uma bioressorção mais rápida comparada à HA estequiométrica (LANDI *et al.*, 2003).

Dados da literatura mostram que a incorporação de Si na estrutura da HA aumenta a bioatividade dos materiais. As cerâmicas à base de Si são capazes de desenvolver uma nova camada de fase apatita biológica na superfície em contato com fluidos fisiológicos mais rapidamente que a HA pura (BOTELHO *et al.*, 2002; PORTER

et al., 2004; VALLET-REGI & ARCOS, 2005). Estudos envolvendo cultura celular descrevem que a proliferação de células ósseas e sua diferenciação são mais importantes sobre a superfície de SiHA que sobre HA. Ademais, o Si induz o aumento da taxa de dissolução conduzindo à liberação dos íons Ca, P e Si no meio de cultura. Logo, uma nova camada de apatita carbonatada se forma rapidamente, tornando-se um local ideal para adesão e crescimento ósseo. O Si liberado pode também se ligar ao oxigênio para formar uma matriz na superfície capaz de reter proteínas de uma maneira organizada, contribuindo para uma estrutura óssea conectada (GIBSON *et al.*, 1999; VALLET-REGI & ARCOS, 2005; BOTELHO *et al.*, 2006). Testes *in vivo* apresentam bons resultados dos materiais contendo Si após implantação (PATEL *et al.*, 2002).

Diversos trabalhos envolvendo a síntese de hidroxiapatita substituída por Si têm sido realizados nos últimos anos. A Tabela II.2 sumariza os principais deles, mostrando porcentagem de Si incorporada, fonte de Si e fases encontradas na estrutura da apatita após tratamento de sinterização.

Tabela II. 2 – Sínteses de hidroxiapatita substituída por Si.

Trabalhos	% Si (massa)	Fonte de Si	Fases
Palard et al (2008)	0,57 – 2,26	Acetato de Silício	HA
	2,83 – 5,65		HA + TCP
Gibson et al (2002)	0,4 – 1,6	Acetato de Silício	HA
Kim et al (2003)	2	TEOS*	HA
	4		HA + TCP +
			Ca ₅ (PO ₄) ₂ (SiO ₄)
Ballas et al (2003)	0,8 – 1,6	Acetato de Silício	HA
Porter et al (2003)	0,4 – 1,5	Acetato de Silício	HA

* TEOS = tetraetilortossilicato

II. 2 – ESTUDO BIOMIMETICO

Em 1990 foi desenvolvido um procedimento por Abe e colaboradores que consistia em colocar o substrato em uma solução sintética de composição iônica semelhante ao plasma sanguíneo, juntamente com uma placa de biovidro G distante de aproximadamente 0,5 mm. Após 7 dias de imersão a 36,5°C observou-se sobre o substrato a uma camada contínua e homogênea de 1µm de espessura composta por cristalitos de hidroxiapatita semelhante à biológica presente no tecido ósseo natural. Esse mecanismo iniciou-se com a dissolução dos íons de silicato provenientes do vidro G e adsorção destes no substrato. Há a nucleação de hidroxiapatita sobre esses íons adsorvidos, os núcleos de HA crescem em função da solução SBF (*simulated body fluid*) supersaturada de íons cálcio e fósforo, formando o recobrimento (ABE *et al.*, 1990).

Este método desenvolvido por Abe e colaboradores (1990) é conhecido como biomimético, pois consiste na imersão de materiais em uma solução que simula a parte inorgânica acelular do plasma sanguíneo, SBF, em temperatura e pH próximos ao fisiológico, ou seja, 37°C e 7,4, respectivamente. A concentração iônica do plasma sanguíneo é apresentada na Tabela II.3.

Desde a primeira formulação da SBF, um grande número de diferentes composições foi proposto (CHOU *et al.*, 2004). Chou e colaboradores (2004) verificaram que não só o tempo de imersão, mas também a concentração das soluções influencia na morfologia da HA precipitada, ou seja, diferentes razões Ca/P dão origem a diferentes morfologias e fases de fosfatos(CHOU *et al.*, 2004).

Tabela II. 3 - Concentração iônica do plasma sanguíneo (Chou *et al.*, 2004).

Íons	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Concentração (mM)	142	5	2,5	1,5	27	103	1	0,5

II.2.1 – Biorreator

O estudo biológico de biocerâmicas visa compreender a resposta em função das características física e química do material. Além disso, estudos têm mostrado a importância de se conhecer o comportamento do material em meios dinâmicos, que mimetizem o fluido intersticial, levando em consideração o fluxo e a temperatura do sistema.

Diante da realidade de que células podiam ser cultivadas *in vitro* em larga escala para a produção de uma gama crescente de produtos para a saúde humana, intensificaram-se os estudos voltados para a definição do conjunto de condições ambientais relevantes necessárias para a proliferação de linhagens celulares *in vitro*. Essa idéia, base para o desenvolvimento de meios de cultivo quimicamente definidos na década de 1980, motivou também o estudo das condições físico-químicas essenciais – pH, temperatura, teor de oxigênio (O₂) dissolvido, etc – para o cultivo celular com fins tecnológicos. Como consequência prática desses estudos, foram desenvolvidos equipamentos visando ao controle dessas condições ambientais, surgindo, assim, os biorreatores destinados ao cultivo de células animais (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

Nos biorreatores, para garantir o desempenho eficiente dos fenômenos de proliferação das células e obtenção do produto celular de interesse, devem-se assegurar as seguintes funções (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005):

- (a) controle do equilíbrio ácido-base (pH) do meio de cultivo;
- (b) controle de temperatura;
- (c) troca de gases que permita um suprimento adequado de O₂, assim como a eliminação do excesso de dióxido de carbono;
- (d) suprimento de nutrientes, utilizando meios de cultivo de formulação adequada;

(e) suprimimento de suporte para adesão celular, no caso do cultivo de células aderentes, e

(f) manutenção da assepsia, evitando contaminação por microrganismos, vírus e outras células.

Em engenharia de tecidos, a cultura dinâmica de células, utilizando-se bioreatores, apresenta resultados promissores. A condição dinâmica promove uma tensão aplicada pelo meio, estimulando a proliferação e diferenciação celular. Além disso, o sistema enriquece o transporte de massa, assegurando uma nutrição contínua das células e constante renovação do meio (BJERRE *et al.*, 2008).

Estudo envolvendo cultura dinâmica de células hMSC sobre arcabouços de TCP substituído com Si resultam em elevada proliferação desde os primeiros dias de cultura e maior atividade da fosfatase alcalina a partir de 7 dias de cultura (BJERRE *et al.*, 2008). Trabalho envolvendo cultivo celular sobre arcabouços de colágeno em um biorreator apresentam de 800 – 1200% de aumento na produção de prostalandina E2, lipídeo marcador de formação óssea, em comparação com a cultura estática (JAASMA *et al.*, 2008)

II.3 - ADSORÇÃO DE PROTEINAS

É importante conhecer as características de superfície do substrato quando se estuda adsorção de proteínas, pois o contato entre as células e o biomaterial é intermediado por camadas protéicas adsorvidas (ANSELME, 2000).

Ressalta-se ainda que não só as características químicas são de crucial importância para otimização de um biomaterial, mas também as físicas como cristalinidade, tamanho de partícula, topografia e energia de superfície. Qualquer interface formada entre duas fases apresenta geralmente um alto valor de energia de

superfície quando comparado ao interior dessa fase. Como resultado, existe sempre uma tendência natural de estabilização termodinâmica promovida pela adsorção de substâncias à superfície. Assim, o primeiro estágio logo após a implantação de qualquer biomaterial no corpo está associado à adsorção de proteínas na sua superfície (NAKANISHI *et al.*, 2001; GRAY J.J., 2004).

Após imersão em fluidos biológicos, os materiais de implante são recobertos por uma camada protéica e a presença dessa camada de proteína pré-adsorvida é essencial a uma melhor resposta celular do material. Essa matriz extracelular é comparável àquela obtida durante a formação *in vivo* da interface tecido – implante (ANSELME & BIGERELLE, 2006a).

Uma matriz extracelular (MEC) possui inúmeras proteínas com múltiplos domínios, cada uma com um sítio de ligação específico para outra macromolécula da matriz e para receptores da superfície celular. A matriz é composta por duas principais classes de macromoléculas extracelulares: as cadeias de polissacarídeos de uma classe denominada *glicosaminoglicanos* (GAGs), e as proteínas fibrosas, incluindo colágeno, elastina, laminina e fibronectina, que exercem funções adesivas e estruturais (ALBERTS *et al.*, 2004).

Visando melhorar a biocompatibilidade de superfícies inertes, algumas proteínas da MEC são incorporadas em materiais poliméricos ou recobrem próteses. O trabalho realizado por (COSTA E SILVA FILHO & CONDE MENEZES, 2004)) avaliou o comportamento de osteoblastos humanos em superfícies de vidro recobertas por fibronectina. Este permitiu concluir que a interação celular inicial é uma propriedade dependente de características físicas e topográficas do biomaterial e da célula. Além disso, a biocompatibilidade, governada pela adesão celular, é dependente do estado de conformação das proteínas usadas para recobrir o substrato.

As biocerâmicas apresentam características favoráveis para adsorção de proteínas, adesão e crescimento celular, em especial fosfatos de cálcio, os quais

apresentam maior capacidade de adsorção de proteínas provenientes dos fluídos, quando comparados com outros materiais (YONGLI *et al.*, 1999; ROUAHI *et al.*, 2006).

II.4 - ADESÃO CELULAR

Vários fatores afetam a adesão celular, dentre eles destaca-se a hidrofobicidade dos materiais. No caso de células fibroblásticas, a adesão celular está diretamente relacionada com baixos valores da componente polar da energia de superfície, ou seja, a superfície mais hidrofílica favorece a adesão. Entretanto, células osteoblásticas apresentam comportamento distinto, já que apresentam maior adesão em superfícies mais hidrofóbicas (KNABE *et al.*, 2002; PONSONNET *et al.*, 2003).

Outro fator importante é a topografia, pois o comportamento dos osteoblastos varia em função da rugosidade superficial do material. Estudos realizados por (KNABE *et al.*, 2002) mostraram que o crescimento de osteoblastos foi muito mais acentuado e homogêneo sobre as superfícies rugosas quando comparado à superfície polida de Ti (KNABE *et al.*, 2002).

A adesão celular envolve vários fenômenos naturais, assim como embriogênese, manutenção estrutural dos tecidos, cicatrização, resposta imune, metástases, além da interação célula/biomaterial. A biocompatibilidade está relacionada ao comportamento celular em contato com os biomateriais e particularmente à adesão celular em suas superfícies. Adsorção, adesão e espraçamento é um processo da interação célula/material, e a qualidade deste influenciará a capacidade celular em proliferar e em diferenciar – se (ANSELME, 2000).

A primeira fase da interação célula/biomaterial é a adsorção, que ocorre rapidamente envolvendo ligações físico-químicas, forças iônicas e de van der Waals, entre as células e os materiais. A segunda fase é de adesão, que ocorre em um tempo mais longo envolvendo biomoléculas, como proteínas provenientes da matriz

extracelular, de membrana celular e do citoesqueleto. O reconhecimento da superfície pelas células é intermediado por proteínas que conduzem sinais de transdução até o núcleo celular (ANSELME, 2000).

II.4.1 - Proteínas envolvidas na adesão celular

Adesão molecular é caracterizada pela sua capacidade de interagir com ligantes específicos, que estão situados na membrana das células vizinhas ou são proteínas de matriz extracelular. Moléculas de adesão pertencem a diferentes classes: caderinas, integrinas, selectinas e imunoglobulinas (ANSELME, 2000).

Os sítios de adesão célula/biomaterial são contatos focais e a sua parte exterior é formada pelas integrinas, que são proteínas receptoras distribuídas ao longo da matriz extracelular. A família das integrinas é composta de 22 heterodímeros dos tipos α e β , elas são heterodímeros transmembranares que consistem de associações não covalentes entre as sub-unidades α e β . Essas proteínas promovem a adesão célula substrato.

Cada integrina possui uma parte extracelular, uma parte membranar e outra parte menor citoplasmática. Esses heterodímeros se ligam a proteínas internas como talina e vinculina. A ligação de todas essas proteínas tem como objetivo transmitir sinais de recobrimento superficial até o interior da célula. As informações chegam ao núcleo celular por meio de reações bioquímicas que se propagam no citoplasma. Ao sinal favorável de adesão o núcleo estimula a produção de feixes de proteínas do citoesqueleto que são arranjados em sua periferia próximo à membrana celular estruturando as projeções celulares e facilitando a adesão (CRAIG & JOHNSON, 1996); (ANSELME, 2000).

Caderinas são glicoproteínas transmembranares que agem em parceria com proteínas intracelulares. O papel destas é permitir a adesão célula-célula. A junção

celular promove a comunicação célula-célula, o reconhecimento celular e a comunicação célula-célula procedem via essa junção (ANSELME, 2000).

II.5 - DIFERENCIAÇÃO

Diversos tecidos no organismo possuem células com poder de proliferação e diferenciação que mantém a saúde e função tecidual. Estas células pouco diferenciadas possuem grande capacidade proliferativa, mantendo a população celular local e permitindo a renovação das células e da matriz extracelular. Ao iniciar sua via de diferenciação, a célula perde gradualmente sua capacidade proliferativa tornando-se um tipo celular verdadeiramente especializado (ALBERTS *et al.*, 2004).

O processo de diferenciação celular é normalmente desencadeado por diversas sinalizações que atingem a célula. Essas sinalizações vão desde contatos focais célula-matriz extracelular (ou célula-célula) até hormônios e fatores de crescimento que a alcançam via circulação. A célula, portanto, recebe estímulos e modifica seu fenótipo metabólico e morfológico com a intenção de responder à modificação exigida pelo organismo em busca da homeostasia. Assim, após a sinalização ou estímulo, a célula inicia uma série de processos transcricionais, ativando genes e produzindo proteínas. Essas podem participar do metabolismo interno celular ou ainda podem ser enviadas à matriz extracelular, constituindo-a.

II.6 - OSTEOLASTOS

Os osteoblastos são as células formadoras de tecido ósseo e, portanto responsáveis pela estruturação do esqueleto. O esqueleto auxilia o organismo na manutenção da forma do corpo e na proteção dos tecidos moles das cavidades

torácica e cefálica. Além de serem pontos de inserção muscular, os ossos transmitem a força muscular das contrações de uma parte a outra do corpo, durante o movimento (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

Entre outras células, o mesênquima perivascular origina a célula osteoprogenitora, que se diferenciara em pré-osteoblasto e, posteriormente, em osteoblasto. Os osteoblastos estão localizados na superfície dos ossos e sintetizam, transportam e organizam os diversos componentes da matriz óssea. Essa matriz é chamada não mineralizada (osteóide) e deverá sofrer um processo de mineralização, mediado pelo próprio osteoblasto, para garantir a dureza e a resistência mecânica típicas dos ossos. Uma vez que o osteoblasto tenha sintetizado a matriz óssea e esteja totalmente envolvido por ela, este passa a ser chamado de osteócito. Alguns osteoblastos permanecerão como células de reserva na superfície óssea, constituindo as células de revestimentos ósseos (ANSELME, 2000).

Antes de iniciar o processo de síntese da matriz óssea, os osteoblastos estabelecem prolongamentos citoplasmáticos entre si e, através de junções comunicantes, garantindo a comunicação celular antes de ser completamente envolvidos pela matriz óssea por eles mesmos produzida. Após serem envolvidos por ela, esses prolongamentos celulares permanecem em estruturas conhecidas como canalículos, muitos dos quais se projetam para as superfícies ósseas para alcançar os vasos sanguíneos e assim garantir a nutrição dos osteoblastos (ANSELME, 2000; ANSELME *et al.*, 2002).

Quando em intensa atividade de síntese dos componentes da matriz óssea, os osteoblastos apresentam formato cubóide com prolongamentos celulares, citoplasma basófilo, núcleo excêntrico e nucléolo proeminente. A ultra-estrutura de um osteoblasto é compatível com a de uma célula que sintetiza proteínas: apresenta abundante retículo endoplasmático rugoso e muitas lamelas do complexo de Golgi, relacionados com a síntese e o processamento dos componentes da matriz óssea. Também estão presentes numerosas mitocôndrias, vesículas do sistema endossômico-lisossômico e

grande quantidade de vesículas de secreção contendo, sobretudo, colágeno tipo I. Os osteoblastos secretam ainda: proteínas não – colagênicas, fatores de crescimento específicos, prostaglandinas, colageneases e fosfatase alcalina. Esta última parece estar envolvida na sinalização transmembrana e tem função na regulação da migração e da diferenciação dos osteoblastos (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

II.6.1 - CULTURA DE CÉLULAS IN VITRO

Em meios fisiológicos o fosfato de cálcio dissolve-se e, conseqüentemente aumenta a concentração de cálcio e fósforo no micro-ambiente. O enriquecimento localizado gera uma supersaturação que induz a re-precipitação de fases contendo cálcio e fósforo. A formação de uma camada fina de apatita sobre amostras favorece a adesão de matriz extracelular, proporcionando adesão celular, condução e diferenciação de osteoblastos residentes ou precursores de osteoblastos (YANG *et al.*, 2005).

Um fator importante na adsorção de proteínas e na cultura de células é o conhecimento dos efeitos da química e da topografia do material sobre o qual serão adsorvidas proteínas. Alguns autores mostram que a rugosidade de superfície influencia a adesão celular, mas é muito difícil isolar a contribuição de cada um dos parâmetros - topografia e química de superfície – no processo de adesão. Visando avançar neste entendimento, foi proposto um recobrimento parcial das superfícies com um filme de ouro. Como a camada de ouro não modifica a rugosidade inicial, torna-se possível mascarar as diferenças em termos de química superfície das amostras, relacionando a adesão de proteínas e comportamento celular apenas com características de topografia (BIGERELLE *et al.*, 2002; ANSELME & BIGERELLE, 2006b).

Um exemplo da utilização desta técnica é o trabalho desenvolvido por Dos Santos e colaboradores, que avaliou a influência química e microtopográfica de superfícies de HA e de β -TCP (β tricálcico fosfato) no comportamento de células osteoblásticas. Este trabalho permitiu concluir que a topografia de ambas as superfícies não apresenta influência significativa no efeito da adesão celular inicial (4 horas). No entanto, a topografia da HA é mais favorável em relação à proliferação celular (evento de mais longo prazo) (DOS SANTOS *et al.*, 2006) .

III. OBJETIVOS

III.1. GERAIS

Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar uma hidroxiapatita substituída com silício com potencial de aplicação na engenharia óssea. Para isso foram utilizadas hidroxiapatitas pura e substituída com Si, visando compreender as transformações de superfície que ocorrem quando esses materiais são imersos em meios de cultura celular com a ausência e presença de proteínas, bem como o comportamento celular sobre essas biocerâmicas, em condições estática e dinâmica.

III.2. ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar hidroxiapatita substituída com silício, precipitada por via úmida.
- Avaliar a transformação de superfícies das hidroxiapatitas estequiométrica (HA) e substituída com silício (HASi) quando em contato com meio de cultura na ausência e presença de proteínas, meio não-completo (MNC) e meio completo (MC), respectivamente.
- Avaliar a adsorção de proteínas sobre estas cerâmicas em contato com MNC e MC, sob condições estática (imersão em placas de cultura celular) e dinâmica (biorreator).
- Avaliar o comportamento de células de linhagem osteoblásticas sobre as cerâmicas, ou seja, adesão, proliferação e diferenciação sob condições estática e dinâmica.

IV. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A Figura IV.1 apresenta um diagrama esquemático do procedimento experimental, que envolve a produção e caracterização dos pós cerâmicos de hidroxiapatita estequiométrica (HA) e substituída com Si (SiHA), avaliação biológica sob condições estática e dinâmica, sendo estudada a biomimetização em meios de cultura com e sem proteínas e cultura de células osteoblásticas sobre as superfícies cerâmicas.

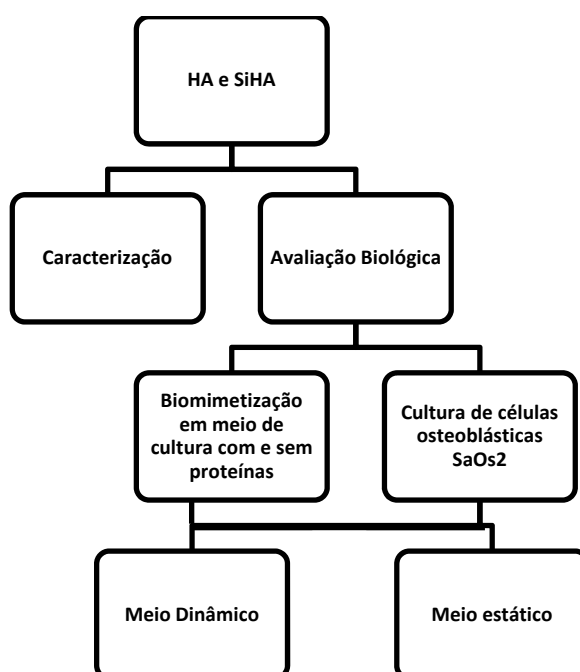


Figura IV. 1 - Diagrama esquemático do procedimento experimental.

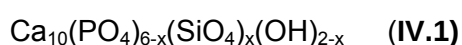
IV.1. OBTENÇÃO DAS HIDROXIAPATITAS PURA E SUBSTITUÍDA COM Si

IV.1.1. Síntese dos pós

Hidroxiapatitas estequiométrica (HA) e substituída com Si (SiHA) foram sintetizadas a partir de precipitação por via úmida, sendo a primeira obtida no Centro

Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF segundo estudos realizados por Mavropoulos *et al.* (2003) e a contendo Si produzida no *Sciences des Procédés Céramique et Traitements de Surface* – SPCTS.

Para a síntese de SiHA, os números de moles, foram definidos em função da composição desejada, $x = 0,4$ (PALARD *et al.*, 2008), levando-se em consideração a razão molar $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})$ igual a 1,67e a fórmula química hipotética, definida por Gibson *et al.* (1999).



A Tabela IV.1 aparenta o números de mols de cada elemento utilizado na síntese de SiHA, de acordo com trabalho desenvolvido por Palard e colaboradores (2008).

Tabela IV. 1 - Número de mols utilizados para síntese de SiHA.

nCa (mol)	nP (mol)	nSi (mol)	% em massa de Si
0,3200	0,1800	0,0128	1,13

Os produtos utilizados para síntese da hidroxiapatita substituída por Si foram: nitrato de cálcio tetra hidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, 99%), diamônio hidrogênio fosfato $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Sigma Aldrich, 99%) e tetraacetato de silício $\text{Si}(\text{CH}_3\text{COOH})_4$ (Sigma Aldrich, 98%).

Os dois primeiros compostos foram utilizados sob a forma de solução em meio aquoso, enquanto que o tetraacetato de silício, sob a forma de suspensão, devido a sua baixa solubilidade em água. Uma etapa preliminar foi necessária para obtenção desta suspensão, sendo que a quantidade necessária do pó de $\text{Si}(\text{CH}_3\text{COOH})_4$, 100 mL de água destilada foram colocados em um recipiente de alumina com 4 esferas, também de alumina, e levadas a um moinho planetário (Pulvérisette – FRISTSCH) por

1 minuto a $150 \text{ Torr} \cdot \text{min}^{-1}$, com o objetivo de quebrar os eventuais aglomerados e homogeneizar a suspensão.

Foram adicionados 200 mL da suspensão de $\text{Si}(\text{CH}_3\text{COOH})_4$ a 100 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e agitou-se por aproximadamente 10 minutos. Em seguida aqueceu-se a 70°C , visando diminuir diferenças de temperatura em relação ao reator, ao qual essa solução foi adicionada com auxílio de uma bomba peristáltica (PD 5001, Heidolph).

A quantidade necessária de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foi adicionada a 500 mL de água destilada, no reator de 2 L, no qual a temperatura foi mantida a 90°C com o auxílio de uma sonda de temperatura (Horst). O gás carbônico atmosférico dissolvido na água foi eliminado por um fluxo de argônio que passa pelo reator por 30 minutos antes do início da reação, sendo que esse fluxo permaneceu constante durante toda a reação e o tempo de maturação. Ademais, acoplado ao reator, foi utilizado um condensador a fim de limitar perdas de líquido por evaporação. O pH do meio reacional foi ajustado a 9, e mantido durante o tempo da reação e da maturação, a partir de uma bomba dosadora (BL 7916 Hanna Instruments) conectada a um eletrodo de pH. O ajuste foi feito a partir da adição de uma solução de hidróxido de amônio NH_4OH (Prob., conc. 28%).

É importante ressaltar que ambas as soluções, fostato-silício e o meio reacional, foram mantidas sob agitação constante durante toda a síntese. Com o fim da adição da solução de fostato-silício, o precipitado formado foi deixado em maturação por 15 minutos, sendo a agitação, fluxo de argônio, regulações de pH e temperatura mantidos por esse período. Ao fim da maturação, o precipitado é recuperado por centrifugação (2500 rpm por 5 min), lavado uma vez com água destilada, e então seco em uma estufa ventilada a 90°C durante uma noite.

IV.1.2. Produção de pastilhas

Como a cinética de sinterização depende da área desenvolvida pelos grãos, foi feita a calcinação de ambas as cerâmicas visando a normalização da área de superfície, entre 30 e 40 m²/g, de acordo com dados da literatura (PALARD *et al.*, 2008). Esse processo foi realizado em um forno tipo mufla, a 650°C por 30 min para HA e 120 min para SiHA, a uma velocidade de aquecimento e resfriamento igual a 5°C/min. A Tabela IV. 2 apresenta valores da áreas de superfície encontrada para os pós de HA e SiHA antes e após calcinação.

Tabela IV. 2- Valores da área de superfície para os pós de HA e SiHA antes e após calcinação.

<i>Material/Condição</i>	HA	SiHA	HA calcinação	SiHA calcinação
Área de superfície (m²/g)	77,91 ± 0.29	50,49 ± 0.29	38,11 ± 0,12	34,11 ± 0,15

Os pós calcinados nas condições especificadas anteriormente foram compactados uniaxialmente em uma matriz utilizando-se uma carga de aproximadamente 1000 ton. Após a prensagem, pastilhas de 10 mm de diâmetro e 2 mm de altura foram obtidas.

IV.1.3. SINTERIZAÇÃO

Visando alcançar uma máxima densificação, foi realizada a sinterização à 1200°C por 1 hora, condição esta que permite a obtenção de pastilhas com um grau de densificação superior a 95%.

Em seguida, as pastilhas foram lixadas em lixas de carbetto de Si de 1200, 2400 e 4000 meshs, e lavadas com água destilada em ultrassom por 3 minutos, para remover partículas provenientes da lixa. A etapa de lixamento foi devido à diferença de rugosidade inicial das pastilhas, sendo, portanto, eliminada a diferença física entre os materiais estudados.

IV.2. CARACTERIZAÇÃO DAS PASTILHAS

IV.2.1. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Após sinterização à 1200°C/1h, as superfícies das pastilhas lixadas, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio JEOL JSM 6460LV (*Laboratoire de Microscopie Electronique* - IS2M/CNRS/França), visando verificar possíveis falhas, tais como, trincas ou poros.

A rugosidade média de superfície (R_a) das pastilhas foi obtida por microscopia de força atômica (AFM, *atomic force microscopy*), no modo contato intermitente (*tapping*), a partir de quatro imagens quadradas (40 x 40 μm) de diferentes regiões de uma mesma amostra. As análises foram realizadas usando-se um nanoscópio do tipo AFM Multimode Nanoscope IV (IS2M/CNRS, Mulhouse).

IV.2.2. Composição das pastilhas

A composição das pastilhas após sinterização foi estimada por meio de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido (ICP), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) por reflectância difusa (DRIFT) e espectroscopia de raios – X (DRX). O EDS acoplado ao MEV foi empregado para análise quantitativa dos elementos presentes.

Para determinação de fósforo (P), cálcio (Ca) e silício (Si) presentes na hidroxiapatita contendo Si, foi usado um espectrômetro de plasma induzido (EMBRAPA, Rio de Janeiro). Os espectros de DRX foram obtidos variando 2θ de 10 a 100° , com uma velocidade de $1/s$ e passo $0,05^\circ$, em um difratômetro de alta resolução RIGAKU MINIFLEX. Para FTIR, as amostras foram trituradas e misturadas com KBr (10% em peso) e os espectros por DRIFT foram obtidos na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} , usando um espectrômetro NICOLET MagnaIR-760. De acordo com dados da literatura, as bandas foram normalizadas a partir de $\nu_4\text{ PO}_4^{3-}$ (602 cm^{-1}) (Rey 1989). Todas as análises, com exceção do ICP, foram conduzidas no IS2M/CNRS, Mulhouse.

IV.2.3. Energia de superfície

A medida de ângulo de contato foi realizada utilizando-se um goniômetro Krüss, G2 (ICSI/CNRS). Duas gotas de aproximadamente 200 μL foram colocadas sobre diferentes regiões de uma mesma amostra, sendo que três amostras foram utilizadas para cada composição de pastilha. Os líquidos utilizados foram água bidestilada, glicerol e di-iodometanano sob temperatura ambiente.

As componentes polar e dispersiva foram obtidas pela teoria de Owens e Wendy (OLIVEIRA *et al.*, 2003; BENZARTI *et al.*, 2006), que apresenta a energia de superfície de um sólido como sendo composta por duas componentes, dispersiva e polar. A componente dispersiva é referente a forças de London, e a componente polar refere-se a forças dipolo-dipolo, dipolo-induzido, ligações de hidrogênio e outras interações com a superfície de caráter polar.

Matematicamente, a teoria é baseada em duas equações de Good e de Young, eq. IV.2 e IV.3 respectivamente, que descrevem as interações entre a superfície sólida e os líquidos.

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2[(\gamma_L^D \gamma_S^D)^{1/2} - (\gamma_L^P \gamma_S^P)^{1/2}] \quad (\text{IV.2})$$

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta \quad (\text{IV.3})$$

Combinando-se essas duas equações, tem-se:

$$(1 + \cos \theta)\gamma_L = 2[(\gamma_L^D \gamma_S^D)^{1/2} - (\gamma_L^P \gamma_S^P)^{1/2}] \quad (\text{IV.4})$$

em que, γ_S^D e γ_S^P são as tensões superficiais dispersiva e polar, respectivamente, da superfície sólida estudada, e γ_L^D e γ_L^P são as tensões superficiais dispersiva e polar, respectivamente, dos líquidos usados, apresentados na Tabela IV. 3.

Tabela IV. 3– Valores das tensões superficiais total, dispersiva e polar dos líquidos usados nesse estudo

Líquidos	γ_L^T	γ_L^D	γ_L^P
Água	72,8	21,8	51,0
Glicerol	64,0	34,0	30,0
Diiodomentano	50,8	50,8	0

IV.3. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

IV.3.1. ESTUDO BIOMIMÉTICO SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA

Para realizar o estudo da transformação de superfície sob condição estática, as amostras foram dispostas em placas de 24 poços para cultura celular e incubadas em atmosfera contendo 5% de CO₂ em uma incubadora (Hera Cell, France) a 37°C. As amostras foram imersas em meio de cultura não completo McCoy's 5A (Sigma, France) ou completo (adicionado com 10% de soro fetal bovino) (VWR, France) por 1, 3, 8 e 14 dias.

Os ensaios dinâmicos foram realizados num sistema contendo um bioaretoar comercializado por MinucellsTM (Alemanha), em que a Figura IV.2 o esquematiza. Todo o sistema foi incubado em uma estufa fechada a 37°C em ar atmosférico. As amostras foram imersas em meio de cultura não completo McCoy's 5A (Sigma, France) ou completo (adicionado com 10% de soro fetal bovino) (VWR, France) por 1, 3, 8 e 14 dias. Uma bomba peristáltica (tipo IPC-N8 de ISMATEC) mantinha um fluxo constante de 2mL/h em todo o sistema. O pH das soluções foi verificado constante (7,4) a cada dia. O sistema, disposto sob um fluxo laminar, era composto de duas garrafas, a primeira contendo meio de cultura McCoy's estéril completo ou não completo, e a segunda de recolhimento do meio, que passava pela câmara onde estavam as amostras. Todo o sistema era esterilizado antes de cada experimento a 105°C e a 1 Bar em uma autoclave modelo VARIOKLAV do tipo 300/400/500 EP-Z.

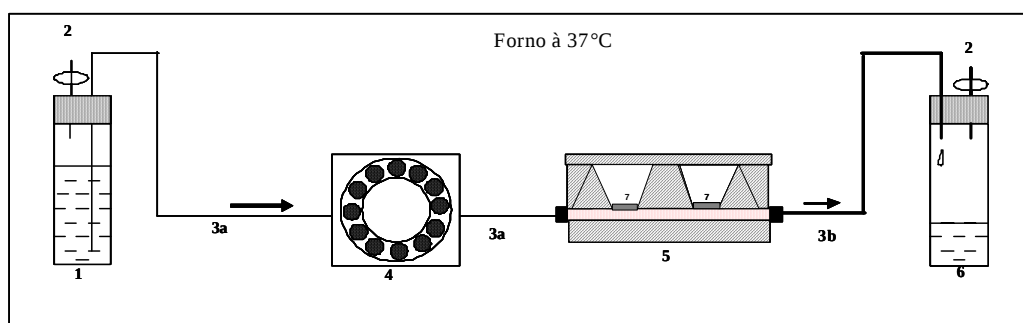


Figura IV. 2 - Diagrama esquemático do sistema do biorreator sob temperatura constante (37°C). Um tubo de silicone (3) faz a conexão entre o novo meio de cultura contido na garrafa (1) (acoplada a um filtro de ar (2)), a câmara contendo as amostras (5) e garrafa de recolhimento do meio (6). Uma bomba peristáltica (4) disposta antes da câmara mantém o fluxo do fluido constante à 2mL/h. Duas amostras (7) foram usadas para cada experimento, ficando permanentemente em contato com o meio, sob fluxo constante.

IV.3.1.1. Caracterização de superfícies

As superfícies das amostras antes e após imersão no meio de cultura foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio JEOL JSM 6460LV. As amostras digitais foram processadas utilizando-se o *software Global Lab Image*.

Microscopia de força atômica (AFM, *atomic force microscopy*), no modo contato intermitente, foi usada para caracterizar a rugosidade média de superfície R_a , como descrito no item IV.2.1.

As superfícies foram caracterizadas quimicamente por espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (*X-Ray photoelectron spectroscopy* – XPS) utilizando um sistema Scienta SES 2002 em condições de ultra alto vácuo ($p < 10^{-9}$ mbar) e uma fonte de raios-X monocromática de Al K α . Os fotoelétrons foram coletados num ângulo nominal de 90° em relação à superfície. As amostras foram degasificadas numa pré-câmara antes de serem transferidas para a câmara de análises. Nenhum procedimento adicional para remover contaminação de carbono foi realizado. Foram utilizados fatores *Scofield* de sensibilidade e o ajuste dos picos foi realizado utilizando o software CASAXPS. Todos os ajustes foram realizados utilizando uma combinação de curvas Gaussianas-Lorentzianas

IV.3.1.2. Análise do meio de cultura

A concentração de cálcio e fósforo no meio de cultura em contato com as amostras de HA e SiHA foi obtida ao fim de cada tempo de imersão (1, 3, 8 e 14 dias) por métodos colorimétricos usando *kits* Cálcio AS FS e Fósforo UV FS fabricados por *Diasys Diagnostic Systems* (França). Análises adicionais foram realizadas para os seguintes tempos de imersão: 30 minutos, 1, 4 e 18 horas.

A concentração de proteínas totais no meio de cultura em contato com as amostras HA e SiHA foi avaliada ao fim de cada tempo de imersão (1, 3, 8, 14 dias) utilizando-se o *kit* Micro BCATM fabricado por *Instructions* (Estados Unidos). A concentração foi obtida a partir da comparação com padrões de albumina (BSA). Análises adicionais foram realizadas para os seguintes tempos de imersão: 30 minutos, 1, 4 e 18 horas.

IV.3.2. AVALIAÇÃO CELULAR SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA

IV.3.2.1. Cultura de osteoblastos

Osteoblastos humanos do tipo SaOs2 na sexta passagem foram descongelados e cultivados a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, em meio de cultivo do tipo McCoy's 5A modificado (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFR) e antibióticos (200U/mL de penicilina e 20µg/mL de estreptomicina). As células foram expandidas em garrafas de cultivo de 75 cm² até confluência. Para cada passagem celular, as células foram tratadas com 2 mL de tripsina/EDTA 0,25% (Sigma) à 37°C por aproximadamente 5 minutos, para que os contatos de adesão célula/superfície e célula/célula fossem desfeitos, sendo as células visualizadas em um microscópio de contraste de fases (Olympus CK X41) para confirmar que a maior parte estivesse em suspensão. Deste modo, finalizou-se a ação da tripsina pela adição de meio de cultivo completo e a suspensão de células foi imediatamente centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio de cultivo completo, para determinação da concentração, a qual foi feita imediatamente em um citômetro do tipo Malassez.

As pastilhas de hidroxiapatita pura e substituída com Si foram esterilizadas a 180°C por 1,5 hora. As amostras foram dispostas em placas de 24 poços, recobertas

com gel de Agar (2% em água) para o estudo estático e em câmaras para o estudo dinâmico. Aproximadamente $4,0 \times 10^4$ células foram plaqueadas sobre as pastilhas e incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 4 horas, 1, 3 e 8 dias. Para ambas as condições de cultura, estática e dinâmica, as células foram aderidas sobre as superfícies das amostras por 24 horas antes de se começar o estudo.

IV.3.2.2. Avaliações celulares qualitativas

O comportamento celular sobre as hidroxipatitas e superfícies controle foi avaliado qualitativamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV - PHILLIPS SEM 525M, *Laboratoire de Microscopie Electronique* – ICSI/CNRS) e por microscopia de fluorescência (microscópio OLYMPUS BX51, IS2M/CNRS, utilizando-se duplicatas.

As células foram fixadas para a análise por MEV, sendo que para cada tempo de cultivo, as amostras foram rinsadas com tampão PBS, em seguida as células aderidas foram fixadas em solução Karnovsky (formaldeído 4,0%, glutaraldeído 2,5% em tampão PBS) por 1 hora. Após fixação, as células foram rinsadas em um tampão NaK₂P 0,175% por uma hora e desidratadas por banhos sucessivos de soluções alcóolicas com as seguintes concentrações: 50, 70, 80, 95 e 100%. Para cada concentração foram realizados 2 banhos de 5 minutos cada. Em seguida, as células foram impregnadas em uma solução etanol/hexametildisilano (HMDS, Sigma) 50:50 (vol/vol) por 10 min, e após em HMDS 100% por 10 min. O HMDS foi retirado e as amostras foram deixadas sob exaustão por 24 horas, para evaporar todo o restante de HMDS ainda presente no interior das células. As amostras foram metalizadas com ouro e examinadas em microscópio eletrônico de varredura.

Para análise no microscópio de fluorescência, as células foram submetidas à imunomarcagem após 1 e 3 dias de cultivo e as células aderidas foram fixadas com uma solução de p-formaldeído 2,0% (tampão PBS) por 1h. Em seguida, este foi retirado e as células rinsadas 3 vezes em tampão NaK₂P 0,175%. Em seguida, as

células foram permeabilizadas numa solução de Triton-X-100 (poli(óxido de elileno) 0,2% em PBS por 15 minutos. As células foram lavadas 3 vezes em PBS, incubadas numa solução de albumina 2.5% em PBS por 20 minutos à temperatura ambiente, e novamente rinsadas 3 vezes com PBS.

Após essa etapa, as amostras foram submetidas a diferentes marcações, sendo da vinculina, proteína responsável pelos pontos focais celulares, do núcleo marcado pela cadeia fluorescente DAPI e da actina, proteína que forma microfilamentos dando origem ao citoesqueleto celular, essa proteína é marcada pela utilização da faloidina. A primeira imunomarcação consistiu na adição do anticorpo contra vinculina humana obtida de rato, deixando-se em contato por 40 minutos em atmosfera úmida a 37°C. Os anticorpos foram recuperados e as células rinsadas 3 vezes (10 minutos, cada) com PBS, em seguida o anticorpo contra TgG do rato acoplado ao TRITC foi adicionados às células e incubado por 40 minutos em atmosfera úmida à 37°C ao abrigo da luz. Recuperou-se o anticorpo e as células foram novamente rinsadas 3 vezes com PBS. Para outras amostras, foi adicionada faloidina-FITC e as células foram incubadas por 40 minutos em atmosfera úmida à 37°C, ao abrigo da luz. A faloidina foi recuperada, e as células rinsadas 3 vezes com PBS. Em seguida, acrescentou-se a solução de DAPI, e as células foram novamente incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Todas as amostras foram dispostas entre lâmina e lamela de vidro, com uma gota de solução de glicerol em PBS na superfície da amostra. As amostras foram então analisadas em um microscópio de fluorescência.

IV.3.2.3. Avaliações celulares quantitativas

IV.3.2.3.1. Proliferação celular e teste de citotoxicidade

O método colorimétrico utilizando o *methyl-thiazolyl-tetrazolium* (MTT) permite a detecção somente de células metabolicamente ativas, e não as inativas ou mortas. Quando esse sal tetrazólico entra em contato com essas células, sofre clivagem pelas mitocôndrias funcionantes, passando da cor amarelo ouro à azul escuro, e quanto mais intensa a tonalidade azul escuro observada pela espectrofotometria, maior o número de células vivas presentes na amostra.

As pastilhas contendo células foram retiradas do meio de cultura e colocadas em uma nova placa de cultivo, onde foram adicionados 1000µl de uma solução mãe 5mg/mL de MTT (Sigma), diluída 10 vezes em PBS, em seguida as células foram incubadas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 3 horas. Após a retirada completa do MTT, 1000µl de isopropanol em meio ácido (300µl de HCl (1N)/100ml de isopropanol) foram adicionados às células. Aguardou-se um tempo de 10 minutos e lavaram-se as pastilhas diversas vezes com a mesma solução a fim que todos os cristais se dissolvessem. Foram retirados 200µL dessa solução e leu-se a densidade óptica à 570 nm em leitor de placa ELISA (ELX, 800UV, BioTec Instruments, INC). Para cada experimento foram utilizadas 3 amostras de cada material, com 3 leituras para cada amostra.

IV.3.2.3.2. Proliferação celular (atividade ALP)

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi medida usando-se p-nitrofenilfosfato, como substrato, numa solução tampão alcalina (20mM p-nitrofenilfosfato + 100mM dietanolamino 98% + 10mM MgCl₂, pH9.5 à temperatura ambiente). Após 8 dias de cultivo, as células foram previamente rinsadas com PBS, e então permeabilizadas numa solução aquosa 0,5% de Triton X-100 e incubadas por 30 min com o substrato a 37°C. Em seguida, a reação foi finalizada a partir da adição de uma solução de EDTA (0,1 M EDTA em 1M NaOH). A densidade óptica da solução colorida obtida foi obtida

por espectrometria UV-visível (leitor ELISA) num comprimento de onda 405 nm, utilizando diluição 1:20 em água. Todo o estudo quantitativo envolvendo células foi realizado em triplicatas.

IV.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Diferenças estatísticas entre as amostras foram determinadas utilizando-se análise de variância do tipo ANOVA (*one-way*) seguido do teste de Tukey, sendo que diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V. 1. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CERAMICAS

A Figura V. 1 apresenta as micrografias eletrônicas das superfícies de (a) HA e (b) SiHA após sinterização a 1200°C. Nota-se que os grãos da superfície de HA são maiores que os encontrados na superfície de SiHA, em concordância dados da literatura que indicam que quanto maior a quantidade de Si substituído na estrutura da hidroxiapatita, menor o tamanho dos grãos (GIBSON *et al.*, 2002).

Como esperado, a rugosidade média (Ra) na superfície de HA apresenta um maior ($p > 0,05$) valor em comparação ao valor equivalente para SiHA, que representa Perfis 3D típicos das superfícies de HA e SiHA obtidos por AFM em modo de contato intermitente com escalas similares. Visando eliminar o efeito da grande diferença de rugosidade das cerâmicas, as amostras passaram por sucessivos polimentos, após o que apresentaram valores de rugosidade menores e muito próximos, 13 ± 1 nm para HA e 11 ± 1 nm para SiHA, assim como mostrado na Figura V.2 a e b.

A Figura V.3 apresenta os padrões de difração dos pós de HA e SiHA, que correspondem ao padrão de uma HA pura (JCPDS 9-432), em que os três picos mais intensos identificados pelos ângulos 2θ de 31,8°, 32,2°, 32,9°, são correspondentes aos planos (211), (112) e (300), respectivamente. Não foi observada a presença de outros fosfatos de cálcio, como fosfato octacálcico (OCP) e monetita nos difratogramas realizados a partir de 0°. Além disso, a partir do teste colorimétrico de detecção de Ca(OH)_2 foi confirmada a ausência de CaO (RAYNAUD *et al.*, 2002). Os resultados de EDS nas amostras examinadas por microscopia eletrônica de varredura confirmaram a presença do Si na estrutura da hidroxiapatita substituída, Figura V.4, sugerindo a formação de uma solução sólida de silício na HA.

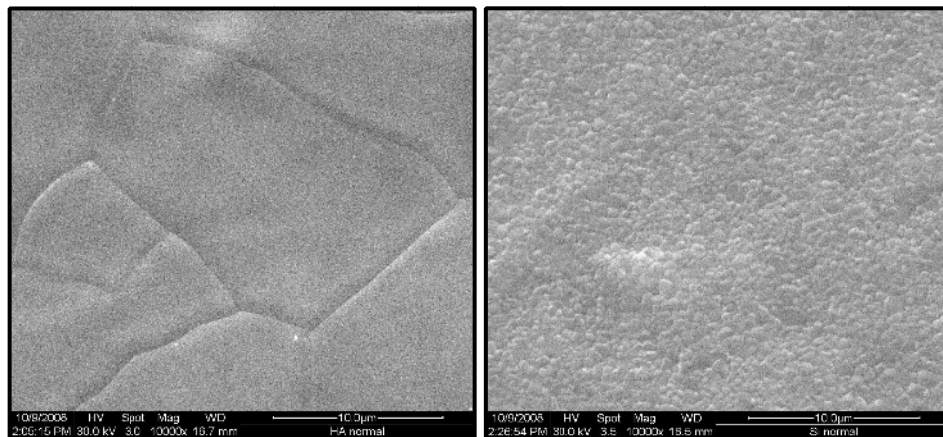
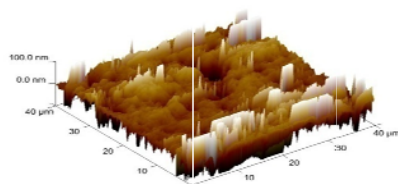


Figura V. 1 - Micrografia das superfícies de (a) HA e (b) SiHA após sinterização à 1200°C/1h e antes do polimento das amostras.

(a)



(b)

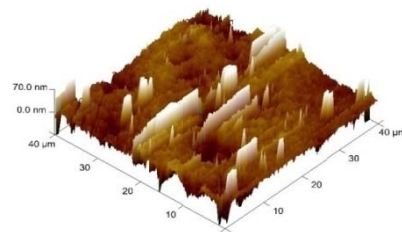


Figura V. 2 - Perfis 3D típicos das superfícies polidas de (a) HA e (b) SiHA obtidos por AFM em modo de contato intermitente.

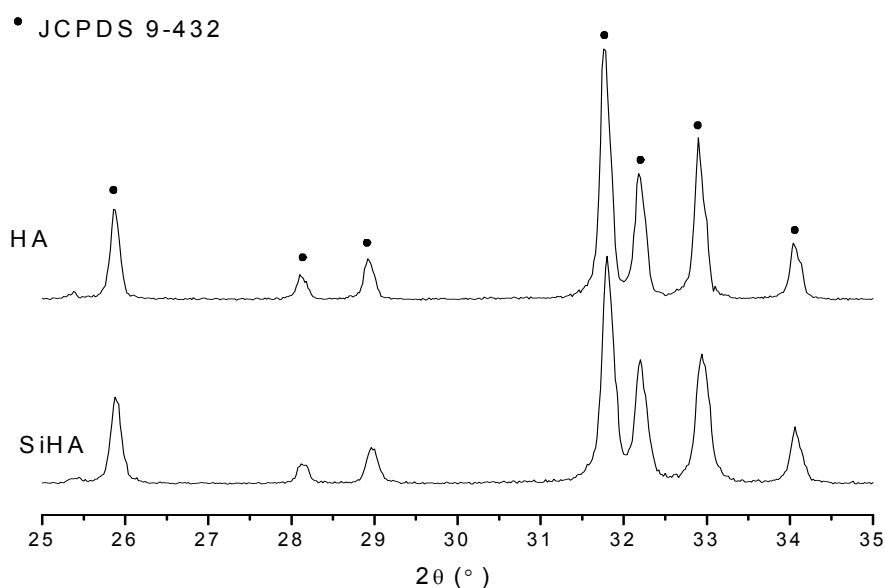


Figura V. 3 - Espectros de DRX dos pós de HA e SiHA sinterizados a 1200°C.

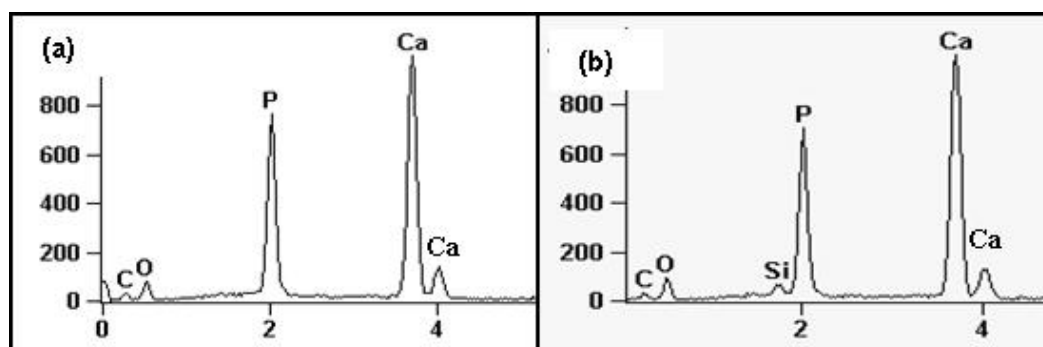


Figura V. 4 - EDS dos pós das hidroxiapatitas (a) pura e (b) substituída com Si.

A Figura V.5 apresenta os espectros de absorção no infravermelho para HA e SiHA sinterizadas à 1200°C por 1h. Notam-se as bandas que caracterizam a fase HA para ambos os materiais estudados: em 1089 (ν_3), 1052 (ν_3), 962 (ν_1), 606 (ν_4) e 550 cm^{-1} (ν_4) referentes ao grupamento PO_4^{3-} e 632 e 3574 cm^{-1} , referentes ao grupamento OH^- . Similar ao sugerido pela literatura (GIBSON *et al.*, 1999), a substituição do grupo fosfato pelo grupo silicato pode ser comprovada pelo balanço de cargas. Desta forma, para SiHA nota-se uma menor intensidade das bandas característicos de OH^- (3570 e 632 cm^{-1}) e PO_4^{3-} em comparação à intensidade das bandas de HA. Além disso,

bandas adicionais (948 – 838 cm^{-1}) aparecem devido à incorporação do Si na estrutura da apatita.

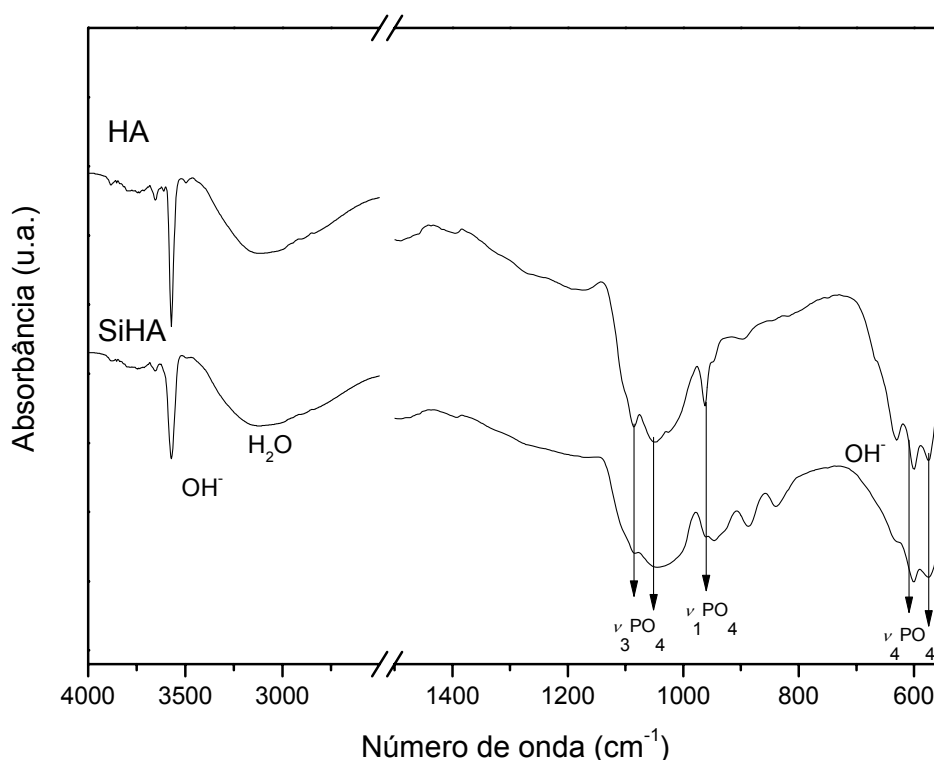


Figura V. 5 - Espectroscopia dos pós das hidroxiapatitas pura e substituída com Si.

A Figura V.6 apresenta as energias de superfícies de HA e SiHA após polimento. As energias de superfícies totais e as componentes dispersivas foram equivalentes comparando-se as superfícies de HA e SiHA. No entanto, a tensão polar de HA foi maior, indicando menor hidrofobicidade da superfície em relação à SiHA. Estudos recentes mostram que o grau de molhabilidade de superfícies está relacionado não só à topografia, mas também à composição química. Logo, mesmo havendo rugosidade equivalente, as superfícies apresentam uma leve diferença na tensão polar devido à diferença de composição, ou seja, o silício aumentou a hidrofobicidade da superfície.

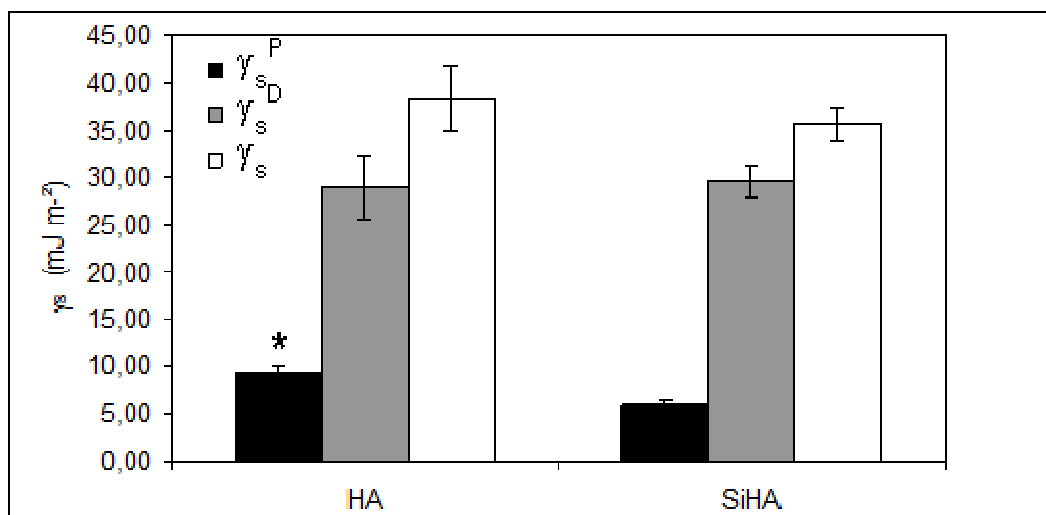


Figura V. 6 - Energias de superfície total γ , dispersiva γ^D e polar γ^P para HA e SiHA.

Diferença significativa de γ^P entre valores referentes à HA e SiHA (*).

A caracterização dos pós de hidroxiapatitas pura e substituída com Si mostrou que o pó produzido pelo método de precipitação via úmida apresenta uma única fase associada apenas à HA, não coexistindo outras fases. Resultados de EDS e FTIR confirmaram a presença do Si na hidroxiapatita. Ademais, a grande diferença morfológica entre as superfícies deve – se ao fato da SiHA apresentar menor tamanho de grão, conseqüentemente, uma menor rugosidade. No entanto, essa diferença topográfica foi eliminada a partir do polimento das amostras, logo, o que será levado em consideração para a continuação do presente estudo será somente a diferença química e a correspondente diferença na componente polar da energia de superfície.

V.2. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

A avaliação biológica consistiu na interpretação da transformação de superfície das biocerâmicas HA e SiHA, quando em contato com meio de cultura não completo (MNC) e completo com proteínas, antibióticos e açúcares (MC), sob condições estática e dinâmica, além do monitoramento de concentrações iônicas do meio de cultura. Apresenta-se também um estudo inicial do comportamento celular sobre essas biocerâmicas, que envolve citotoxicidade, morfologia celular e dosagem de fosfatase alcalina.

V.2.1. ESTUDO BIOMIMÉTICO

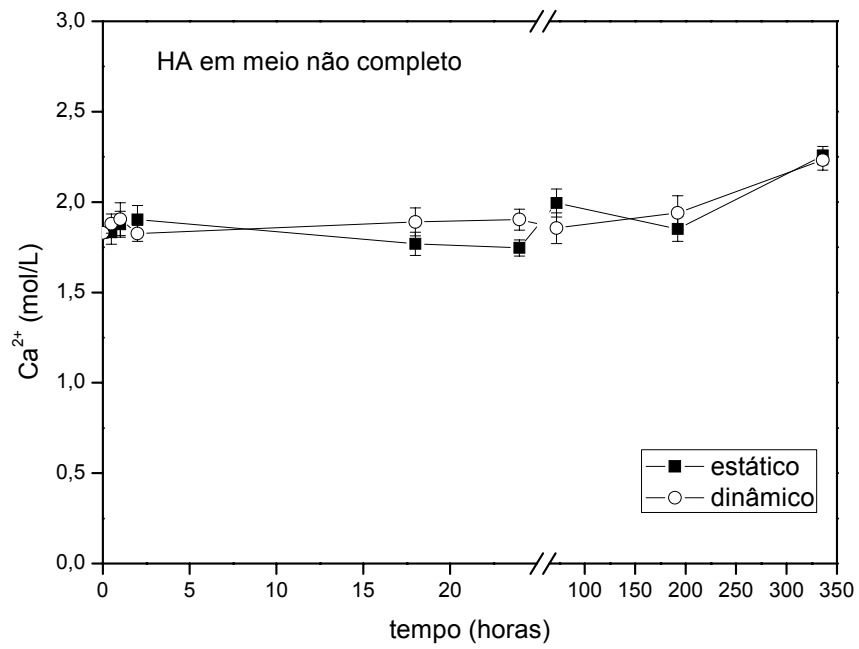
V.2.1.1. Concentração de cálcio e fosfato nos meios de imersão

Foi determinada a variação da concentração de cálcio e fósforo em função do tempo no meios não completo (MNC) e completo (MC) após imersão em condições estática e dinâmica das amostras de HA e SiHA.

As Figuras V.7 e V.8 apresentam a concentração de cálcio em MNC e MC para HA e SiHA, respectivamente, em função do tempo de imersão. Um pequeno aumento na concentração de cálcio no MNC foi observado para HA imersa por 14 dias nas condições estática e dinâmica, caracterizando liberação de cálcio, enquanto que nenhuma diferença foi observada para SiHA nas mesmas condições. Para imersões em meio completo de cultura, não foram observadas variações da concentração em função do tempo e da condição de cultura, tanto para HA quanto para SiHA.

Para ambas as cerâmicas, sob ambas as condições estática e dinâmica, a concentração de cálcio permaneceu relativamente estável até 8 dias de imersão.

(a)



(b)

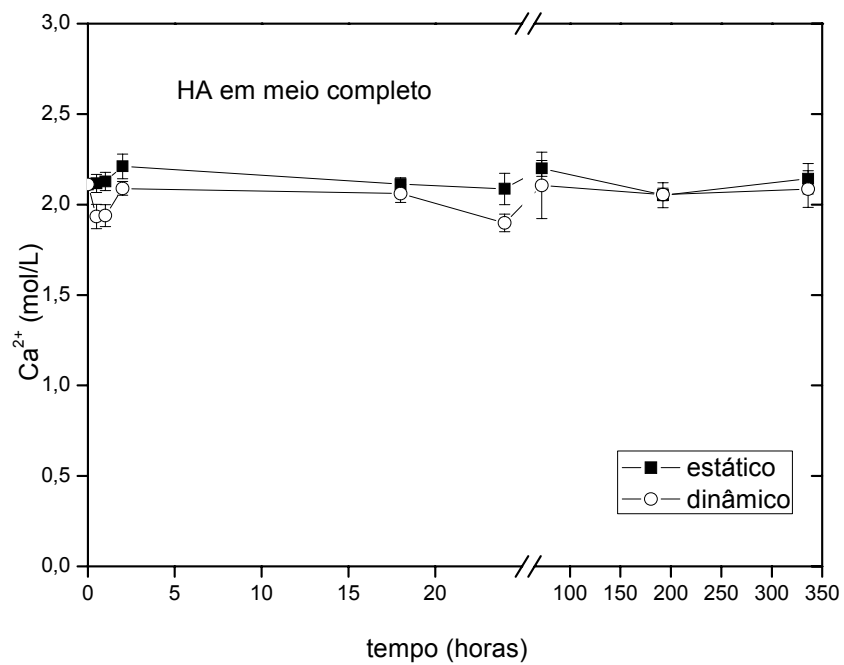
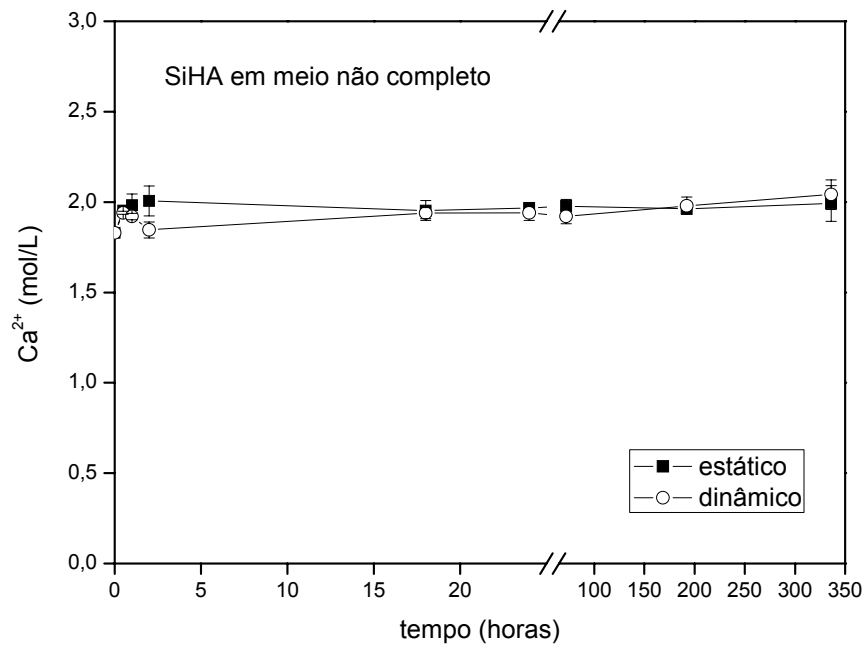


Figura V. 7 - Concentração de cálcio sob condições estática e dinâmica para HA em (a) MNC e (b) MC.

(a)



(b)

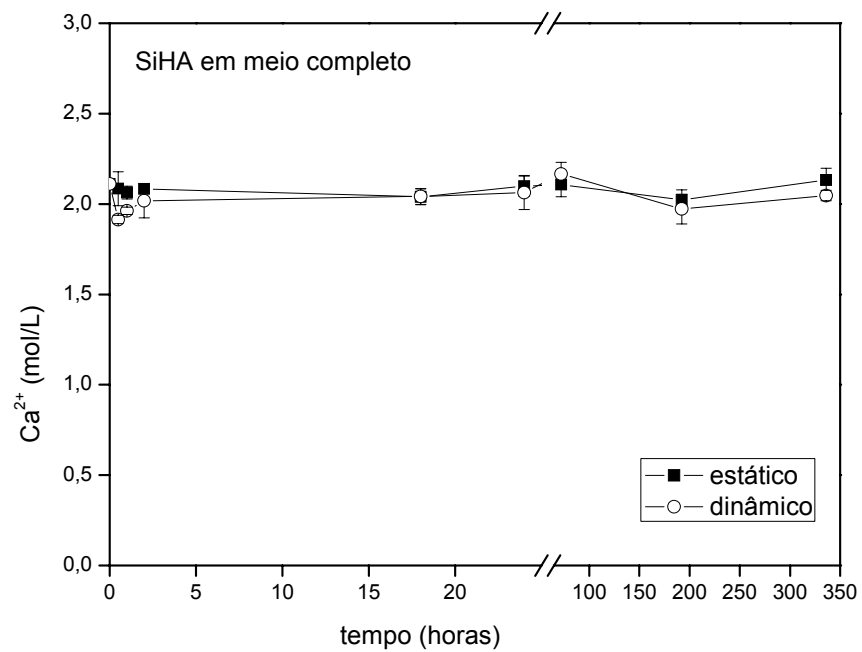


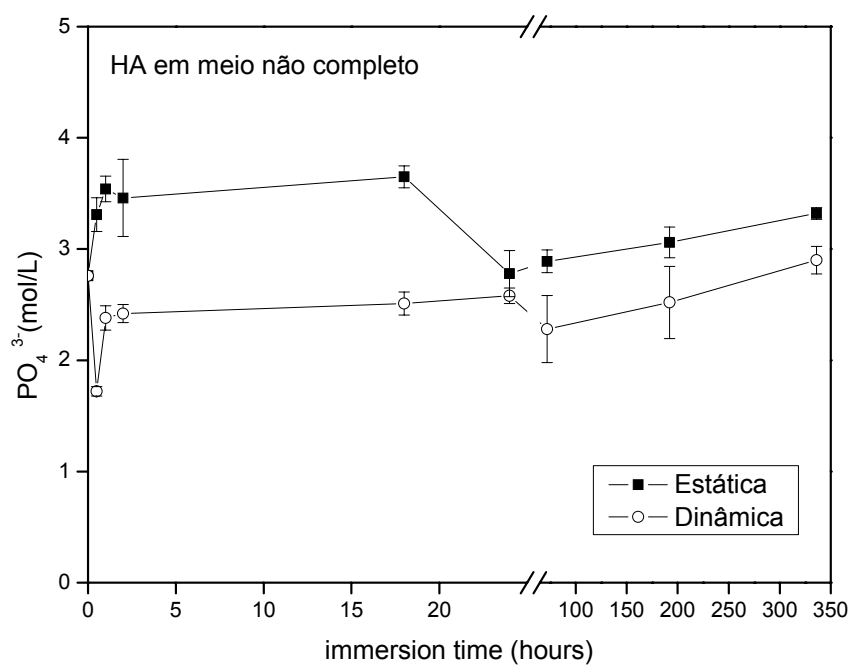
Figura V. 8 – Concentração de cálcio sob condições estática e dinâmica para SiHA em (a) MNC e (b) MC.

As Figuras V.9 e V.10 apresentam a concentração de fosfato em MNC e MC para HA e SiHA, respectivamente, em função do tempo de imersão. A concentração de fosfato apresentada é significativamente diferente comparando-se as condições estática e dinâmica, principalmente entre SiHA e HA.

Para HA imersa em meio não completo (MNC), a concentração de fosfato foi sistematicamente menor na condição dinâmica, em comparação à estática. Em MNC, Figura V.9 a, a concentração do fosfato aumentou significativamente após 30 minutos na condição estática até 18 horas, mas diminuiu após 30 minutos e permaneceu inalterada em condição dinâmica para os mesmos tempos. O aumento da concentração do fosfato em MNC durante as primeiras horas de imersão estática demonstra rápida dissolução inicial da superfície de HA. Após 24 horas, a quantidade de fosfato foi equivalente em condições estática e dinâmica. Com o passar do tempo de imersão, a concentração de fosfato aumentou numa taxa aproximadamente constante correspondendo a uma regular dissolução da HA.

No meio completo de cultura, Figura V.9 b, após 30 minutos de imersão, nota-se um aumento da concentração de fosfato para condição estática e uma diminuição para a dinâmica. Após duas horas em ambas as condições, a concentração do fosfato alcançou novamente a concentração inicial do meio e permaneceu constante até 72 horas. Após esse tempo, observa-se um aumento da concentração para condição estática e uma diminuição para a dinâmica. Novamente, isso pode ser explicado pelo processo de dissolução dividido em duas fases, a fase inicial rápida que ocorre nas primeiras duas horas e a segunda, mais lenta começando a partir de 3 dias de imersão. Finalmente, nota-se que a imersão na condição estática favorece o processo de dissolução da HA, enquanto que para a condição dinâmica, inicialmente induz-se a precipitação do fosfato, que resulta na redução da taxa de dissolução.

(a)



(b)

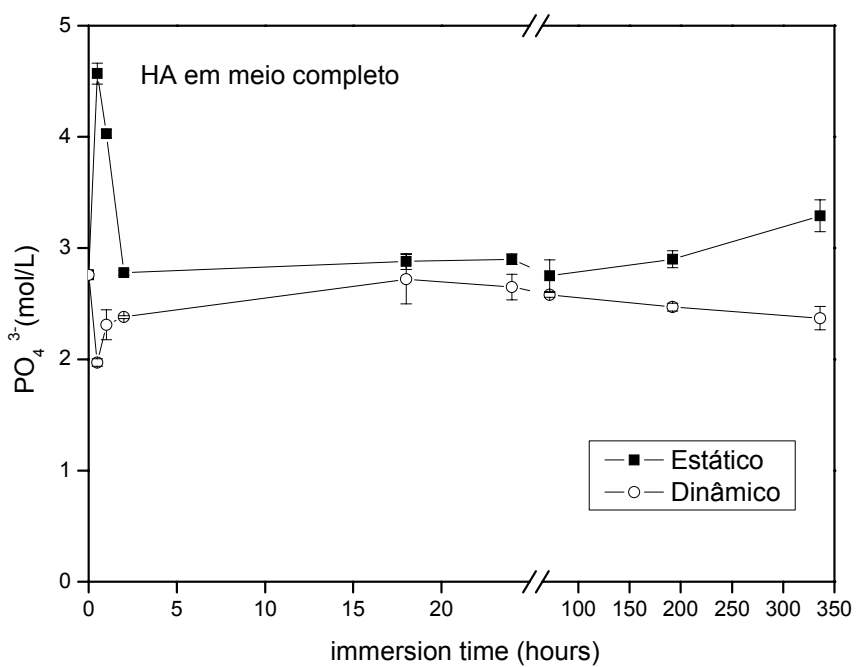


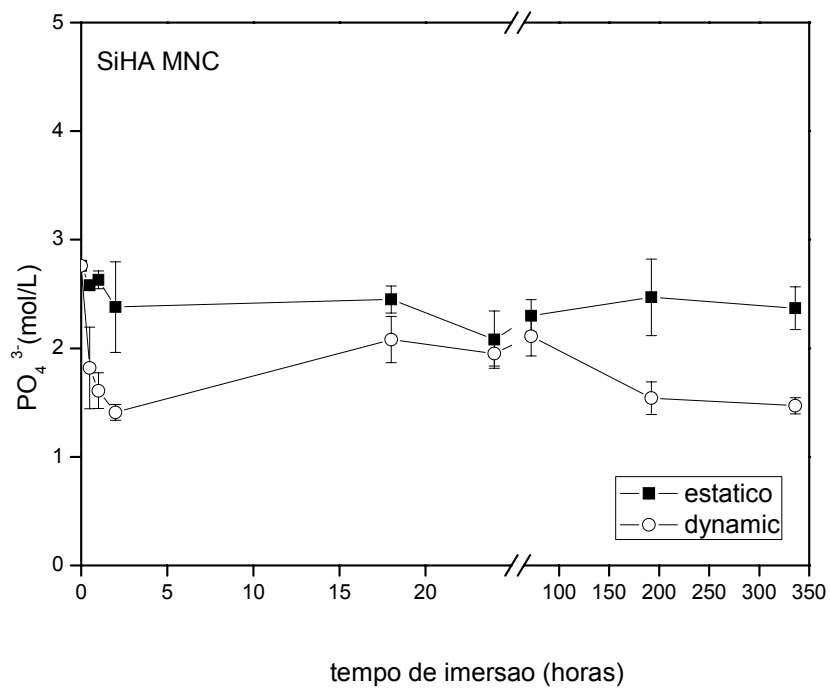
Figura V. 9 - Concentração de fosfato nos meios (a) não completo e (b) completo após imersão de HA.

Para SiHA, Figura V.10, similarmente à HA, a concentração de fosfato foi sistematicamente menor em condição dinâmica, que em estática. Em meio não completo, a concentração de fosfato diminui significativamente após 30 minutos em condição dinâmica, mas aumentou novamente e alcançou os valores da condição estática após 24 horas, Figura V.10 a.

A concentração de fosfato diminui novamente após 72 horas, demonstrando um maior volume de precipitação que em condição estática. Ao contrário da HA, SiHA não apresentou nenhuma dissolução significativa após imersão estática em MNC. No meio de cultura completo, Figura V.10 b, não foi observada uma forte variação com o tempo de imersão em condições estática e dinâmica, mas um aumento da concentração de fosfato foi observado após 30 minutos em condição estática, enquanto que uma pequena diminuição foi observada em condição dinâmica. Novamente, um aumento na concentração de fosfato foi observado em condição dinâmica após 14 dias de imersão estática.

Esses resultados *in vitro* indicaram uma quantidade aproximadamente constante de cálcio, mas uma diminuição da concentração de fósforo no meio completo (MC) com a exposição aos materiais. Logo, a camada de apatita precipitada nas amostras HA e SiHA deve corresponder a uma apatita cálcio deficiente com razão Ca/P menor que 1,67.

(a)



(b)

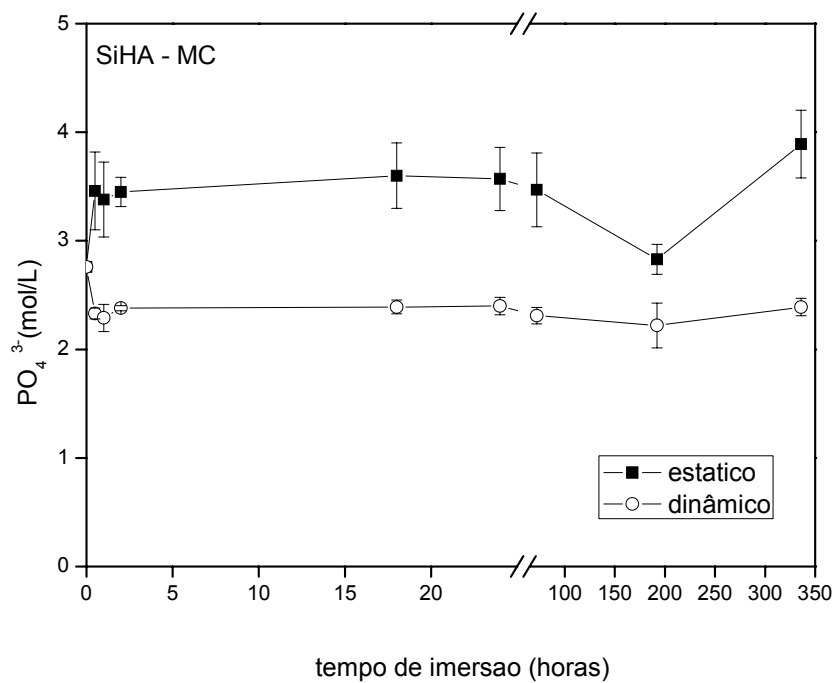


Figura V. 10 - Concentração de fosfato nos meios (a) não completo e (b) completo após imersão de SiHA.

V.2.1.2. Concentração de proteína

A Figura V.11 apresenta a concentração de proteínas adsorvidas para ambas as amostras, sob condições estática e dinâmica. Todos os resultados referem-se a imersão em meio completo (com soro fetal bovino), em que a concentração inicial de proteína era de 5,96 mg/mL para todos os experimentos.

Após 30 minutos de imersão da HA sob condição dinâmica, foi observada uma adsorção de aproximadamente 2mg na concentração de proteína, sugerindo uma adsorção mais rápida pelo efeito do fluxo de meio de cultura. Após 2 horas, não foram observadas diferenças significativas entre as condições estática e dinâmica.

Ao contrário da HA, para SiHA, a diferença das concentrações das condições estática e dinâmica persistiu após 30 minutos, indicando assim, que a adsorção de proteína em SiHA foi maior para condição dinâmica em relação à estática. Comparando-se ambas as cerâmicas sob condição dinâmica, é possível notar uma maior adsorção de proteína na SiHA após 2 horas de imersão.

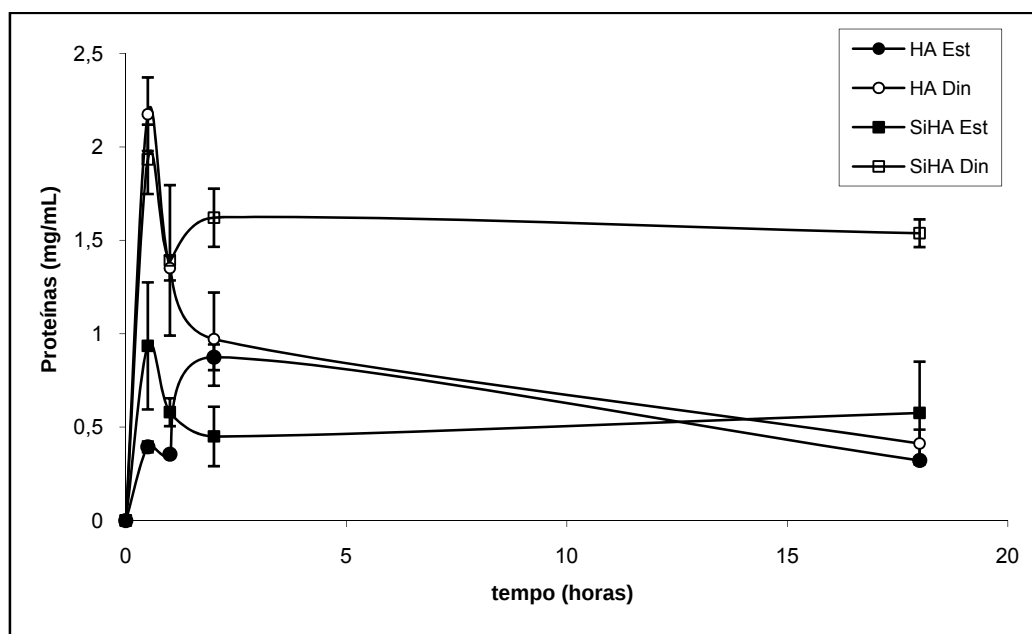


Figura V. 11 - Dosagem de proteínas adsorvidas na superfícies de HA e SiHA imersas em meio de cultura completo sob condições estática e dinâmica.

V.2.1.3. Análise de superfície após imersão

Após imersão em meio não completo (MNC) e completo (MC), as superfícies das cerâmicas apresentaram diferentes aspectos dependendo da condição e tempo de imersão. As Figura V.12 e V.13 apresentam, respectivamente, micrografias de HA e SiHA imersas em MNC sob condições estática e dinâmica.

As superfícies de HA e SiHA apresentam morfologia características do processo de precipitação/dissolução, contudo nota-se um processo mais acelerado para amostras imersas sob condição dinâmica, provavelmente devido à constante renovação do fluído. Ressalta-se a formação de precipitados em forma de flores sobre superfícies de SiHA sob condição dinâmica após 1 e 3 dias de imersão, Figura V.13. Acredita-se que esse fato seja ligado aos íons de Si dissolvidos no meio de cultura, no entanto não foram encontrados dados na literatura que relatasse tal morfologia de precipitados.

As Figuras V.14 e V.15 apresentam micrografia das superfícies imersas em meio completo sob condições estática e dinâmica para as cerâmicas HA e SiHA, respectivamente. Ao contrário do que foi exposto para superfícies imersas em MNC, a morfologia da superfície das cerâmicas imersas em meio completo não apresenta precipitados ou aspecto de dissolução nos primeiros dias. Como apresentado na Figura V.11, a adsorção de proteínas ocorre nos primeiros minutos de imersão, logo uma camada de proteína é formada, o que retarda e até mesmo impede a troca iônica com o meio.

As superfícies de HA imersas por 14 dias apresentam precipitados, Figura V.14. No entanto há grande diferença entre as superfícies imersas sob as condições

estática e dinâmica, sendo que sob a última condição a superfície apresenta-se repleta de precipitados, provavelmente devido à renovação constante do fluido, além da tensão causada pelo fluxo, favorecendo assim a troca iônica com o meio.

Nota-se um processo de dissolução pra amostras de SiHA, Figura 15, sob condição dinâmica, que aumenta gradativamente com o tempo de imersão, fato esse que pode ser devido não só à maior solubilidade de SiHA em relação à HA, mas também ao fluxo constante do meio, que acelera a troca iônica.

Figura V. 12 - Micrografias das superfícies de HA imersas em meio não completo (MNC) sob condições estática e dinâmica.

Figura V. 13 - Micrografias das superfícies de SiHA imersas em meio não completo (MNC) sob condições estática e dinâmica.

Figura V. 14 - Micrografias das superfícies de HA imersas em meio completo (MC) sob condições estática e dinâmica.

Figura V. 15 - Micrografias das superfícies de SiHA imersas em meio completo (MC) sob condições estática e dinâmica.

A Figura V.16 apresenta micrografias obtidas por AFM de amostras SiHA imersas em MNC e MC por 3 dias sob condição dinâmica, em escala de 10 μm x 10 μm . Comparando-se as superfícies, nota-se uma menor quantidade de precipitados para as amostras imersas em meio completo, Figura 16 b. O mesmo ocorre para superfícies de HA, com a amostra imersa em meio completo apresentando menor fração volumétrica de precipitados. Além disso, superfícies de SiHA apresentam maior quantidade de precipitados do que superfícies de HA sob as mesmas condições (imagens não mostradas). Nas escalas de 1 μm x 1 μm e 300 nm x 300 nm foi observado que os constituintes do soro fetal bovino cobriram os grãos da cerâmica com uma camada uniforme. O que leva a crer que os constituintes orgânicos adsorvidos na superfície dos materiais seja responsável pela diminuição da precipitação da apatita cálcio deficiente. A causa desse retardo pode ter sido devido (i)

à adsorção de proteínas nas superfícies, ocupando os sítios onde a precipitação ocorre e (ii) íons de cálcio e/ou fósforo foram mascarados pelas macromoléculas do soro, assim como proteínas, enzimas, glicose, uréia, etc. Vários autores (ROHANIZADEH *et al.*, 1998; COMBES & REY, 2002; JUHASZ *et al.*, 2008) reportaram que os componentes do soro adsorvido na superfície da hidroxiapatita retardam a precipitação da camada superficial, sugerindo a importância dos constituintes orgânicos na transformação *in vitro* das cerâmicas. Essa hipótese é confirmada pela baixa variação da concentração de fosfato após imersão em meio completo sob condições estáticas e dinâmicas.

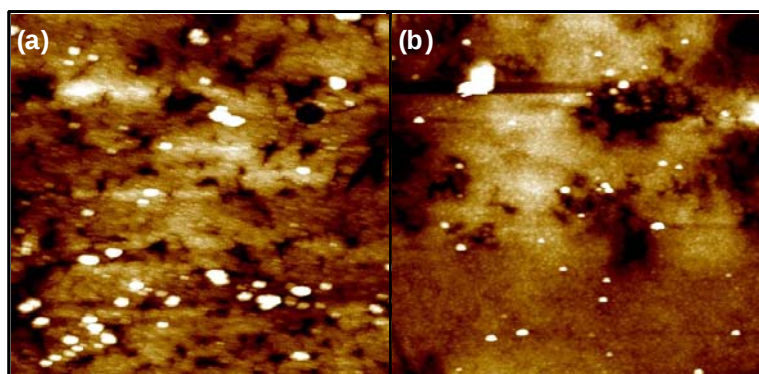


Figura V. 16 - Micrografias obtidas por AFM de SiHA imersas em (a) em meio não completo e (b) completo sob condição estática por 3 dias, escalas iguais (10 μm x 10 μm).

As superfícies imersas em meio não completo apresentaram uma quantidade muito maior de precipitados, especialmente para SiHA, provavelmente devido à liberação de Si, criando sítios de nucleação para precipitação da apatita.

A Figura V.17 apresenta os valores de rugosidade (Ra) para HA e SiHA após 3 dias de imersão em meios completo e não completo, sob condição estática e dinâmica. Superfícies imersas em MC sob condições estáticas e dinâmicas exibiram menores valores de Ra em comparação às amostras imersas em MNC. A presença da

camada de proteínas adsorvida na superfície do material pode ser a origem desse efeito. Pode-se ainda notar que Ra aumenta para amostras imersas em MNC comparadas às amostras controle sob as duas condições de cultura, enquanto que para MC, esse fato foi somente observado para a condição dinâmica, de acordo com o teste de Turkey ($p < 0.05$).

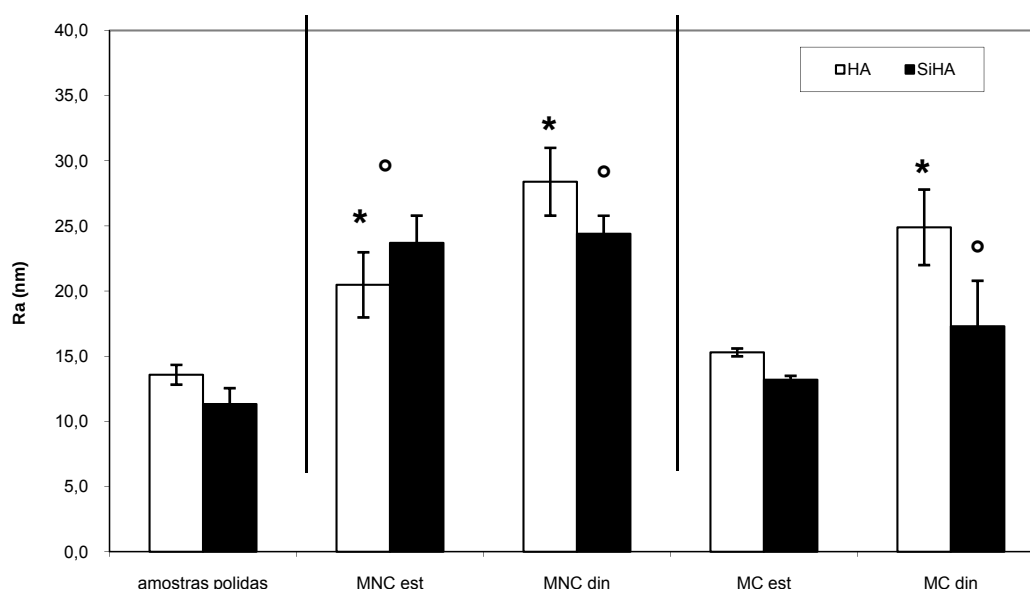


Figura V. 17 – Rugosidade medida por AFM após 3 dias de imersão em meio não completo (MNC) e meio completo (MC) sob condições estática (est) e dinâmica (din). * e °, representam diferença significativa em comparação às amostras polidas para HA e SiHA, respectivamente, $p < 0,05$.

V.2.1.4. Química de superfície

Como descrito anteriormente, a dosagem dos íons de cálcio e fósforo no meio, sugeriu a precipitação de uma apatita deficiente em cálcio nas superfícies estudadas. A composição química dessas superfícies foi analisada por XPS e as Figuras V.19 e V.20 apresentam gráficos da razão Ca/P nas superfícies imersas em meios não completo e completo, respectivamente. Nota-se para imersões tanto em MNC quanto para MC, que a razão Ca/P é sempre menor para superfícies imersas sob condição

dinâmica, exceto para 14 dias de imersão de SiHA, em que as concentrações são iguais para ambas as condições de cultura. Logo, acredita-se que a constante renovação do fluido, gerada pela condição dinâmica, favorece a precipitação de apatita cálcio deficiente.

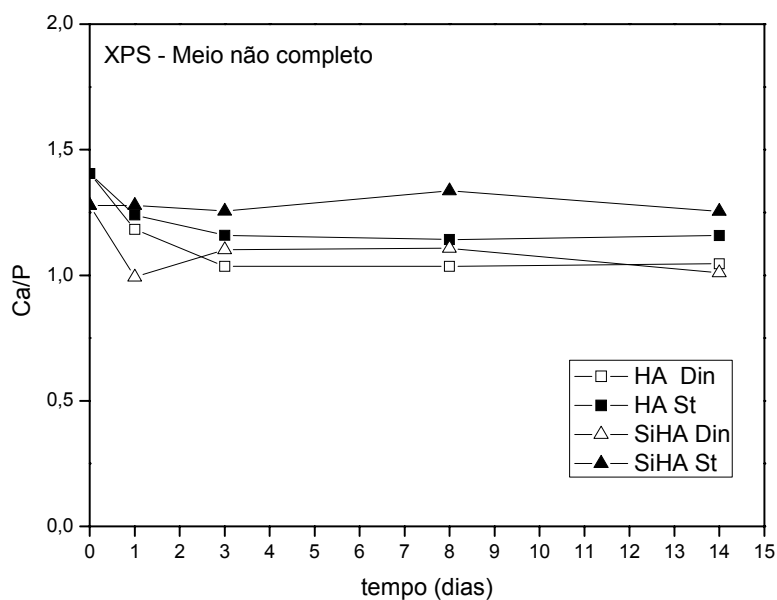


Figura V. 18 - Razão Ca/P das superfícies de HA e SiHA imersas em meio não completo sob condições estática e dinâmica.

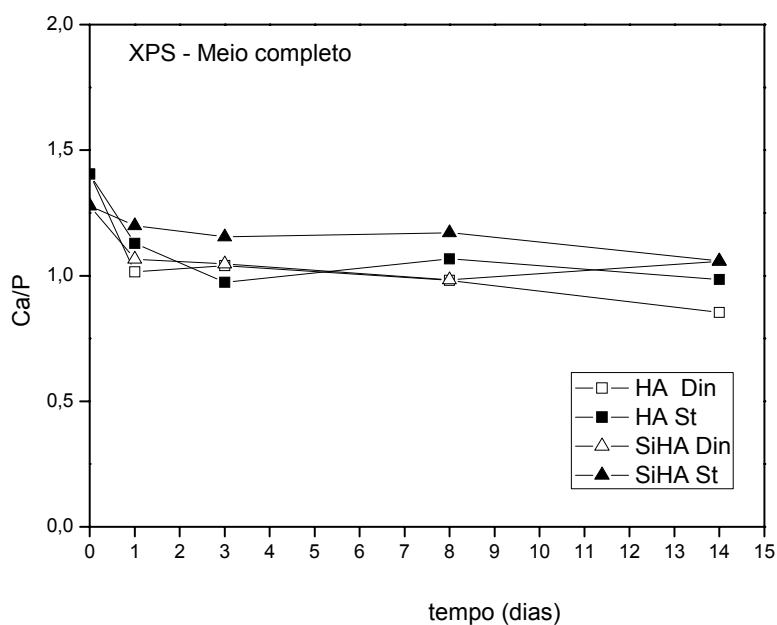


Figura V. 19 - Razão Ca/P das superfícies de HA e SiHA imersas em meio completo sob condições estática e dinâmica.

A Tabela V.1 apresenta o teor de Mg obtida a partir de análises de XPS e EDS das amostras de HA e SiHA após 3 dias de imersão nos meios completos e não completos. O aumento da quantidade de Mg foi observado sobre ambas as cerâmicas após imersão sob condição dinâmica tanto em MC quanto em MNC. Este aumento é visto após um dia de imersão em MC (dados não mostrados) e após 3 dias em MNC. A fonte de Mg nos experimentos é o sal $MgSO_4$ presente no meio de cultura McCoy's. Os componentes do soro fetal bovino (proteínas, enzimas, lipídeos, etc) podem também apresentar uma pequena quantidade de Mg.

Resultados de EDS confirmam essa mudança no teor de Mg nas superfícies. Novamente, um aumento de Mg foi observado apenas sob condição dinâmica para as duas cerâmicas nos dois meio de cultura. Nota-se que é possível detectar essa variação do Mg por EDS apesar de que EDS alcance maior profundidade (1 μm) que XPS (10 nm), o que confirma que a precipitação de Mg é significativa.

Tabela V. 1 – Variação do magnésio sobre as superfícies de HA e SiHA obtida por XPS e EDS em função das condições experimentais após 3 dias de imersão em meios completo e não completo.

Amostra	Meio não completo		Meio completo	
	XPS (%at)	EDS (%at)	XPS (%at)	EDS (%at)
HA controle	0,63	0	0,63	0
HA condição estática	0,43	0	0	0
HA condição dinâmica	4,02	$0,21 \pm 0,12$	2,4	$0,07 \pm 0,02$
SiHA controle	0,60	0	0,60	0
SiHA condição estática	0,79	0	0	0
SiHA condição dinâmica	2,51	$0,22 \pm 0,19$	1,9	$0,14 \pm 0,01$

A razão da precipitação de Mg sobre as superfícies sob condição dinâmica ainda não é claramente conhecida, no entanto, acredita-se que o fluxo constante de meio de cultura, renovando assim o meio, seja responsável por induzir esta precipitação.

A análise de XPS detectou Mg, mas não sob a forma do sal MgSO_4 . Logo, os precipitados de magnésio podem estar presentes sob as formas de carbonatos ou fosfatos, caso tenham sido precipitados com sais contendo PO_4^{3-} and CO_3^{2-} no meio. De acordo com Okazaki (OKAZAKI, 1991) a presença de Mg gera uma diminuição da cristalinidade acompanhada com uma boa reatividade. Além disso, o fato do magnésio estar presente na rede da apatita Ca-deficiente precipitada sobre as superfícies sob condição dinâmica, explica os menores valores da razão Ca/P para esta condição, apresentados nas Figuras V. 18 e 19.

Os resultados do estudo biomimético, resumidos na Tabela V.5, demonstram poucas diferenças entre os comportamentos de HA e SiHA após as imersões, com exceção para adsorção de proteínas sob condição dinâmica, que é significativamente maior para SiHA. A imersão de ambas as cerâmicas no meio não-completo sob condição estática induziu a dissolução das superfícies, enquanto que para imersão no meio completo, as superfícies foram menos modificadas, ficando cobertas com uma camada de proteína. No entanto, imersões sob condição dinâmica induziram a precipitação de uma camada de apatita cálcio deficiente enriquecida por Mg, o que pode ser responsável pelo aumento da bioatividade das cerâmica.

Tabela V. 2 – Resumo dos resultados de HA e SiHA sob condições estática e dinâmica, MNC: meio não completo, MC: meio completo, NA: não aplicável. . =, +, -, +/-: mudanças em concentração no meio de imersão em comparação à concentração inicial ou mudança em Ra (rugosidade) ou quantidade de Mg nas superfícies em comparação com a superfície controle.

	Condição		Ca	P	proteínas	MEV	AFM	Ra	Mg	Conclusões
HA	estática	MNC	=	+	NA	Sinais de dissolução	Sinais de dissolução	+	=	Dissolução
		MC	=	+	=	Sem modificação	Sem modificação	=	=	Nenhuma modificação ou camada homogênea de proteína
	dinâmica	MNC	=	+/-	NA	Sinais de precipitação	Sinais de precipitação	+	+	Precipitação de (Ca,Mg) apatita
		MC	=	-	-	Sem modificação	Sem modificação	+	+	Precipitação de (Ca,Mg) apatita + proteínas
SiHA	estática	MNC	=	=	NA	Sinais de dissolução	Sinais de dissolução	+	=	Precipitação/Dissolução
		MC	=	+	=	Sem modificação	Sem modificação	=	=	Nenhuma modificação ou camada homogênea de proteína
	dinâmica	MNC	=	-	NA	Sinais de precipitação	Sinais de precipitação	+	+	Precipitação de (Ca,Mg) apatita
		MC	=	-	-	Sem modificação	Sem modificação	+	+	Precipitação de (Ca,Mg) apatita + proteínas

V.2.2 – CULTURA DE CÉLULAS

V.2.2.1 – Cultura de células sob condição estática

(a) Adesão Celular

A eficiência da adesão celular, medida por método colorimétrico e avaliada após 4 horas de cultivo, sobre as superfícies cerâmicas HA e SiHA, não apresenta diferença significativa, como mostrado na Figura V. 21. Trabalho realizado por Dos Santos e colaboradores (2006) permite concluir que as diferenças topográficas pouco afetam a adesão inicial dos osteoblastos, no entanto esta é maior quando a componente polar do material diminui. Neste caso, a eficiência da adesão não variou, visto que a diferença de polaridade entre as superfícies é muito pequena.

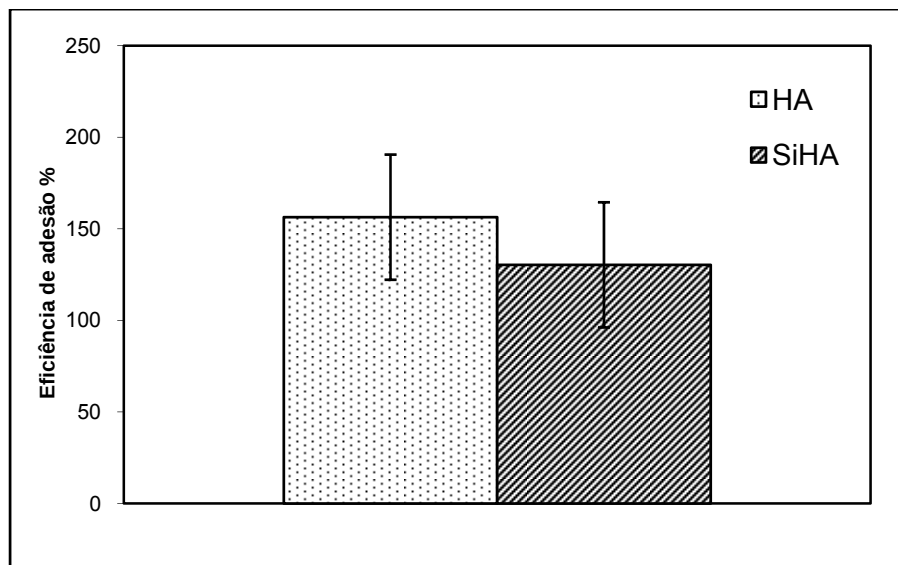


Figura V. 20 - Eficiência da adesão correspondente à razão entre o número de células aderidas sobre as amostras após 4h e o número de células aderidas sobre o controle.

(b) Espraiamento celular

Assim como a adesão, após 24h em cultivo, a área média das células sobre HA e SiHA foi comparativamente igual, Figura V. 22. Sendo possível afirmar que o espraiamento não apresenta diferenças em função da química do material, visto que ambos apresentam mesma rugosidade (Ra).

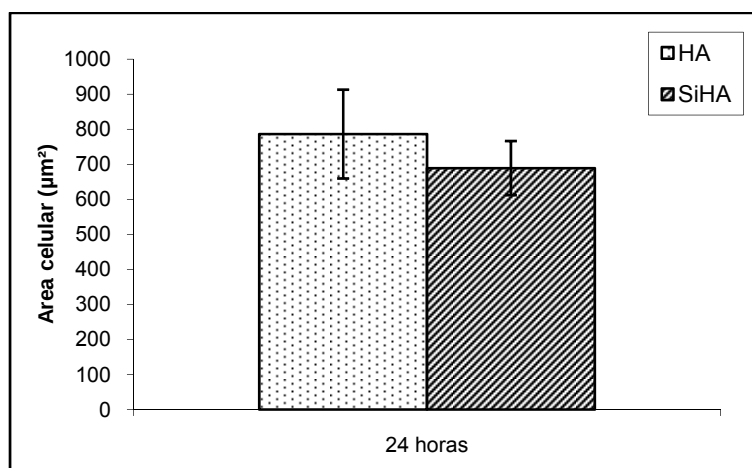


Figura V. 21 - Espraiamento celular sobre superfícies HA e SiHA após 24 horas de cultivo.

(c) Formação de contatos focais e fibras de tensão

A adesão das células pode ser definida particularmente pela distribuição de contatos focais, os quais se constituem em pontos de adesão célula/substrato. A distribuição de contatos focais das células cultivadas sobre as superfícies cerâmicas foram estudadas por meio da imunomarcagem da vinculina após 3 dias em cultivo, Figura V.22. Notam-se aglomerados bem definidos ao longo da borda das células aderidas sobre ambas as superfícies. A partir de análise de imagem, Figura V.23, é possível observar aglomerados sobre HA com diferentes tamanhos, sendo que as maiores frequências são entre 5,5 - 7,5 µm. O mesmo é notado sobre SiHA, em que

os aglomerados também são de tamanhos e frequências variadas, apresentando maior frequência para a ordem de 3,5 – 5 μm .

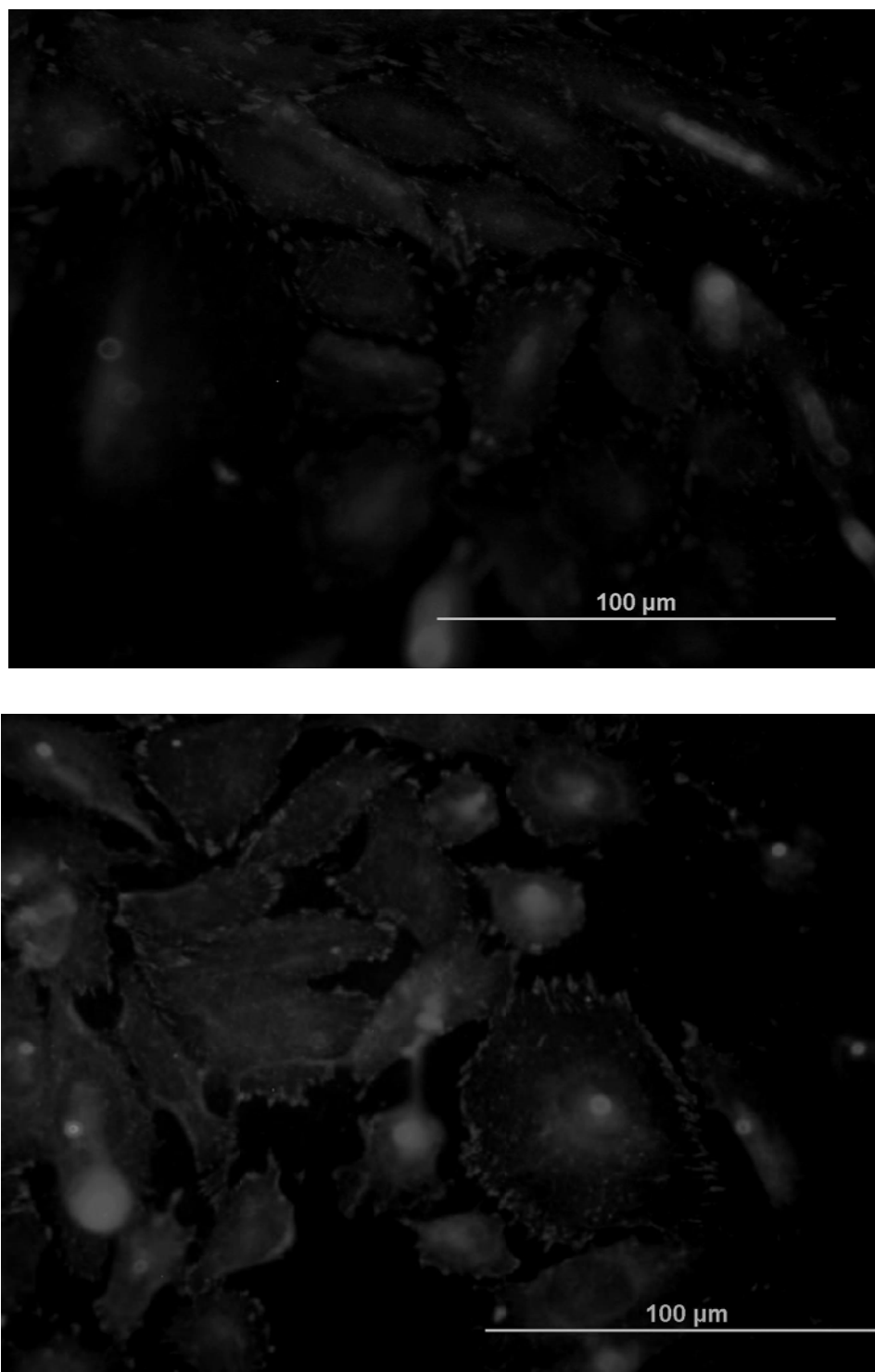


Figura V. 22 - Imunomarcacão da vinculina nas células cultivadas sobre as superfícies de HA e SiHA após 3 dias

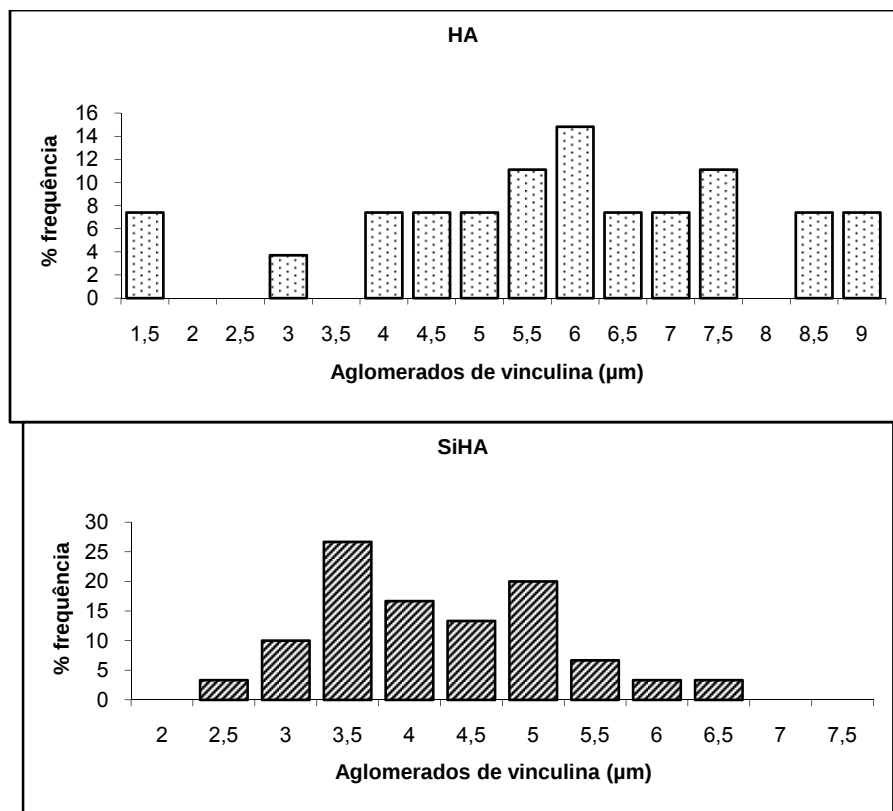
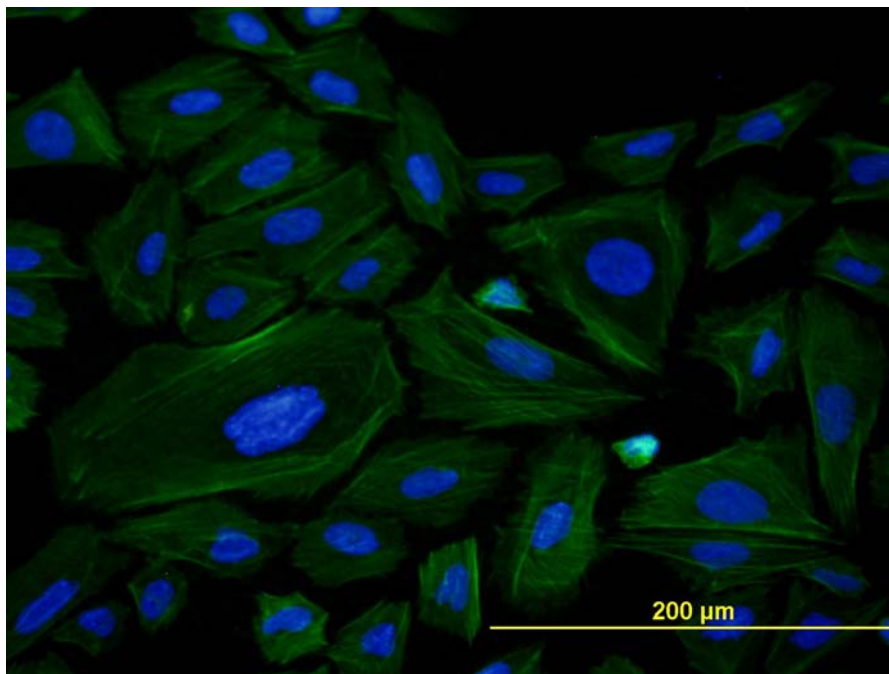


Figura V. 23 - Aglomerados de vinculina nas células cultivadas por 3 dias sobre superfícies de HA e SiHA.

A adesão celular é seguida pela reorganização de seu citoesqueleto de actina (F-actina) resultando em espreadimento e movimentação celular. A formação de fibras de tensão caracteriza esta reorganização, que pode ser estudada por meio de imunomarcção da proteína F-actina. A Figura V.24 apresenta imunomarcção do DNA (azul) e filamentos de actina (verde). Após 3 dias de cultivo, o DNA no núcleo celular apresentam uma morfologia normal em ambas as superfícies, assim como visto na literatura (THIAN *et al.*, 2006). Ademais, fibras de tensão uniformemente distribuídas ao longo de todo o corpo celular foram observadas tanto para células aderidas sobre HA, quanto para aquelas sobre SiHA. Observa-se que sobre HA a maior parte das fibras são de forma mais densa e concentrada.

Por análise de imagem, foi obtida a área média das células cultivadas sobre HA e SiHA para 1 e 3 dias de cultivo, Figura V.25. Ressalta-se que apenas sobre HA houve um aumento significativo da área celular com 3 dias de cultivo.

HA



HASi

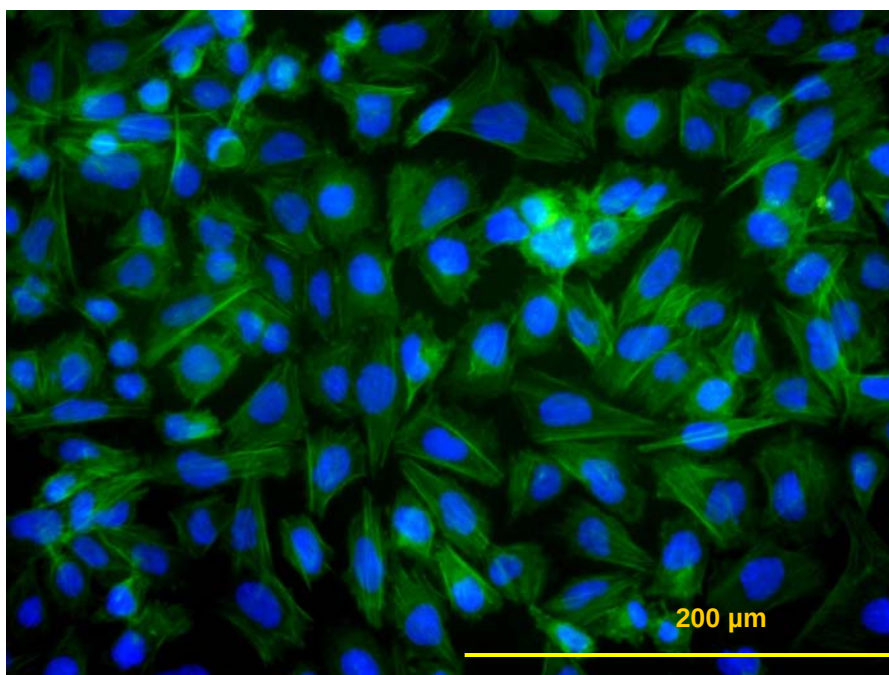


Figura V. 24 - Marcação do DNA, apresentando o núcleo em azul, e F-actina por faloidina-FITC (verde) nas células cultivadas por 3 dias sobre as superfícies HA e SiHA.

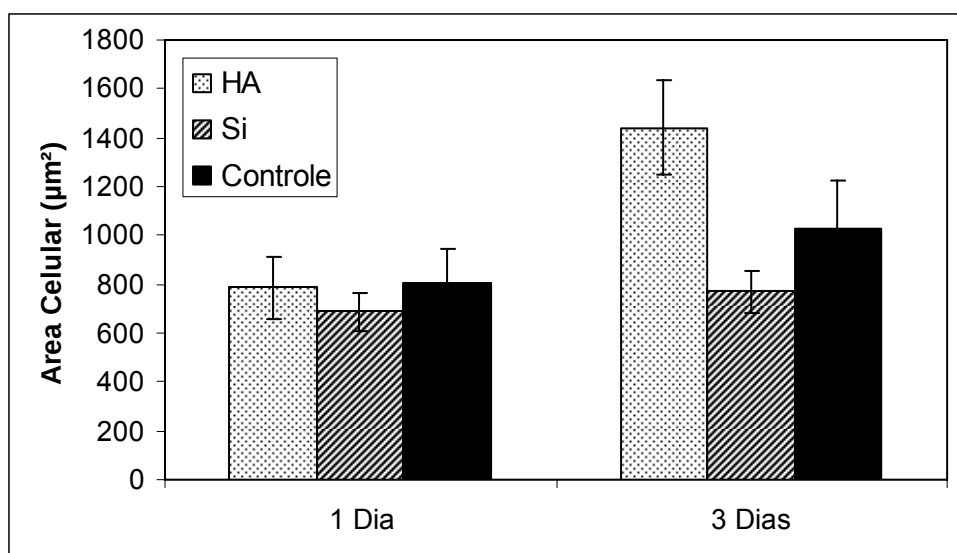


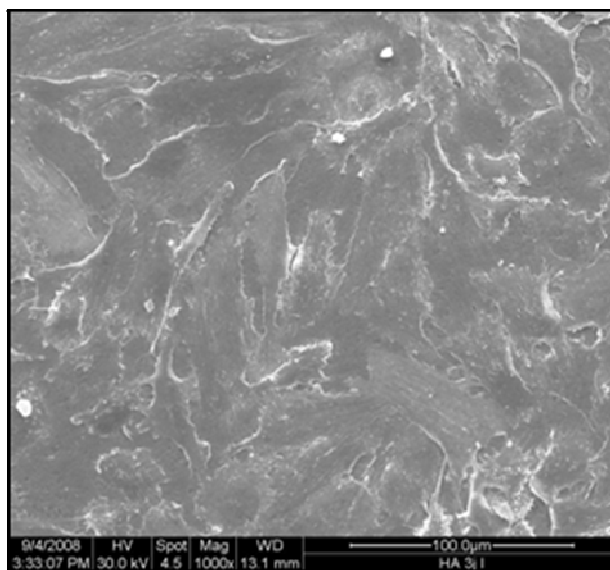
Figura V. 25 - Área média celular sobre as superfícies de HA, SiHA e controle (Thermanox) para 1 e 3 dias de cultivo.

Conforme mostrado anteriormente, após 3 dias de cultivo, as células sobre HA apresentam maior área celular e com maiores aglomerados de vinculina, enquanto que sobre SiHA, as células não apresentam variação da área celular em função do tempo de cultivo.

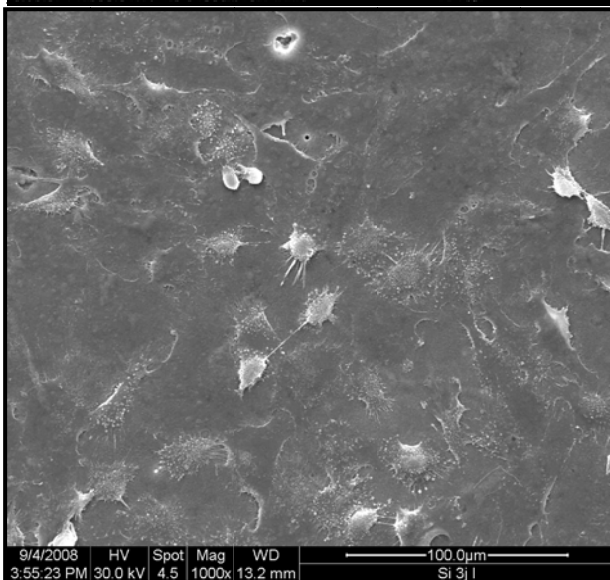
(d) Morfologia Celular

A Figura V. 26 apresenta micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das células osteoblásticas cultivadas sobre HA, SiHA e Thermanox por 3 dias. Nota-se que as células se apresentam de forma mais numerosa sobre as superfícies cerâmicas, em comparação ao controle (Thermanox), e com maior área celular para a superfície HA, confirmando resultados obtidos por imunomarcação da faloidina.

HA



SiHA



Controle

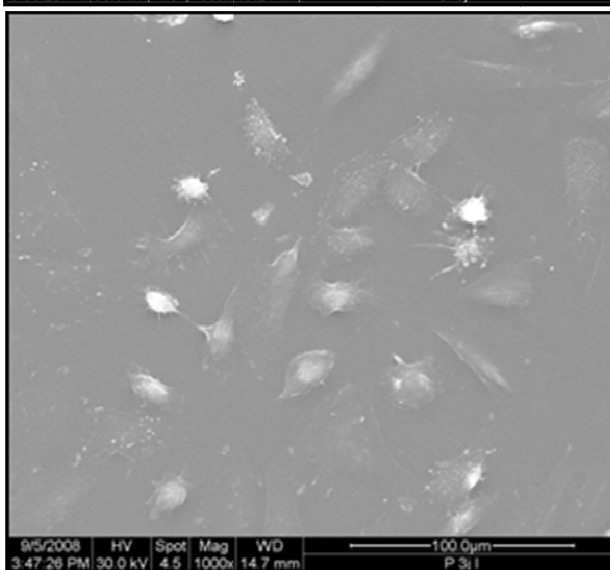


Figura V. 26 - Micrografias obtidas por MEV das células cultivadas sobre as superfícies HA, SiHA e controle por 3 dias.

(e) Atividade celular – MTT

Após 24 h, Figura V.27, a atividade celular (proliferação) sobre as superfícies cerâmicas não apresentou diferenças, no entanto foi significativamente maior em relação ao controle, o mesmo ocorreu após 3 dias de cultivo. Com 8 dias de cultura, a atividade celular sobre SiHA foi maior em comparação ao controle e a HA, caracterizando uma maior quantidade de células aderidas sobre essa superfície.

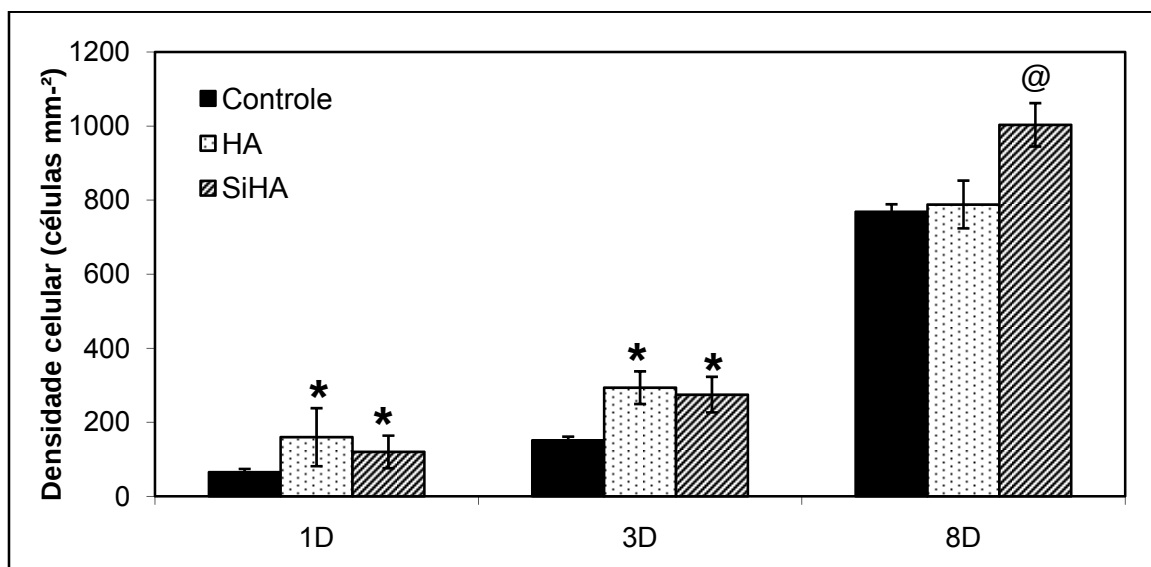


Figura V. 27 - Perfil de crescimento das células SaOs2 ao longo do tempo sobre as superfícies controle, HA e SiHA. Diferenças significativas para um mesmo tempo de cultivo das superfícies cerâmicas em relação ao controle (*). Diferença significativa para um mesmo tempo de cultivo entre as superfícies cerâmicas (@).

(f) Diferenciação celular (atividade de fosfatase alcalina)

Uma vez aderidas na superfície, os osteoblastos se proliferam e se todas as condições estiverem corretas, entram no estágio de diferenciação (SHU *et al.*, 2003). A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima produzida pela atividade dos osteoblastos envolvidos na diferenciação celular, sua presença é um indicador de que as células já

estejam em processo de diferenciação. A Figura V.28, apresenta os níveis de ALP sobre as superfícies HA, SiHA e controle após 8 dias de cultivo. Notam-se que os níveis desta enzima sobre HA e SiHA foram maiores comparados àquele sobre a superfície controle, no entanto não houve diferença significativa entre os níveis obtidos sobre as cerâmicas.

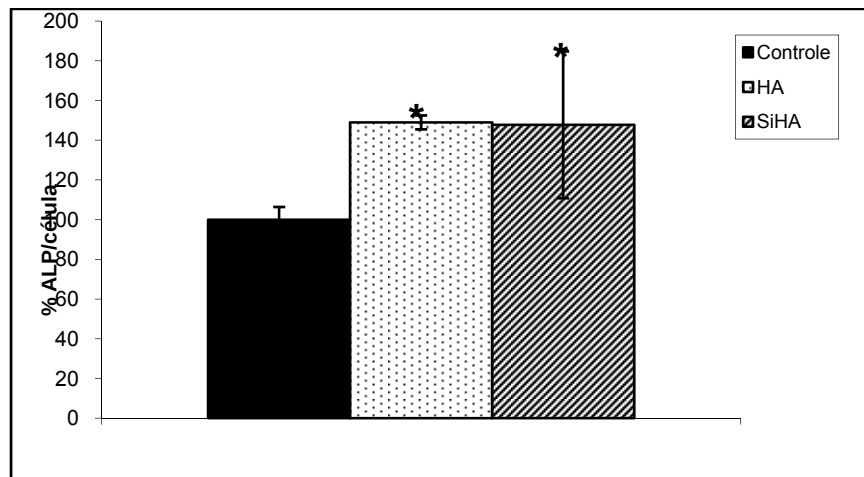


Figura V. 28 - Nível percentual de fosfatase alcalina por célula após 8 dias de cultivo sobre as superfícies HA, SiHA em relação ao controle (Thermanox). Diferenças significativas em comparação ao controle (*).

Conforme descrito, a avaliação celular sob condição estática apresentou resultados em função da química da superfície, que estão sumarizados na Tabela V.3. Ressalta-se que as diferenças encontradas foram para área celular após 3 dias de cultivo e proliferação após 8 dias.

Tabela V. 3- Resposta celular para cultura estática sobre superfícies de HA e SiHA.

Avaliação celular		Resposta
Adesão celular	4 horas	HA = SiHA
Área celular	1 dia	HA = SiHA
	3 dias	HA > SiHA
Proliferação - MTT	1 dia	HA = SiHA
	3 dias	HA = SiHA
	8 dias	HA < SiHA
Fosfatase alcalina (ALP)	8 dias	HA = SiHA

V.2.2.2 – Cultura de células sob condição dinâmica

Em engenharia de tecidos, a cultura dinâmica de células, utilizando-se biorreatores, apresenta resultados promissores. A condição dinâmica promove uma tensão aplicada pelo meio, estimulando a proliferação e diferenciação celular. Além disso, o sistema enriquece o transporte de massa, assegurando uma nutrição contínua das células e constante renovação do meio (BJERRE *et al.*, 2008). Foi feito um estudo inicial de cultura de células sob condição dinâmica, que envolve avaliação da atividade celular (proliferação), da diferenciação celular, formação de contatos focais e fibras de tensão a partir de microscopia de fluorescência.

(a) Atividade celular – MTT

A Figura V. 29 apresenta dados referentes à proliferação celular e toxicidade das superfícies cerâmicas sob condições estática e dinâmica. Assim como mostrado anteriormente, Figura V.27, as cerâmicas não são citotóxicas. Após 3 dias de cultivo, nota-se um aumento significativo no número de células para a condição dinâmica, provavelmente devido às constante renovação do meio e maior transferência de massa favorecendo a proliferação celular. Após 8 dias de cultivo sob condição dinâmica, praticamente não houve um aumento no número de células. Para o mesmo tempo de cultivo sob condição estática, nota-se um maior número de células sobre HA que sobre SiHA. E importante ressaltar que as células foram cultivadas por 24 horas sobre as superfícies antes de se iniciar este estudo. Logo, os resultados para 8 dias de cultivo sob condição estática apresentados na Figura V.27 não podem ser comparados aos da Figura V.29.

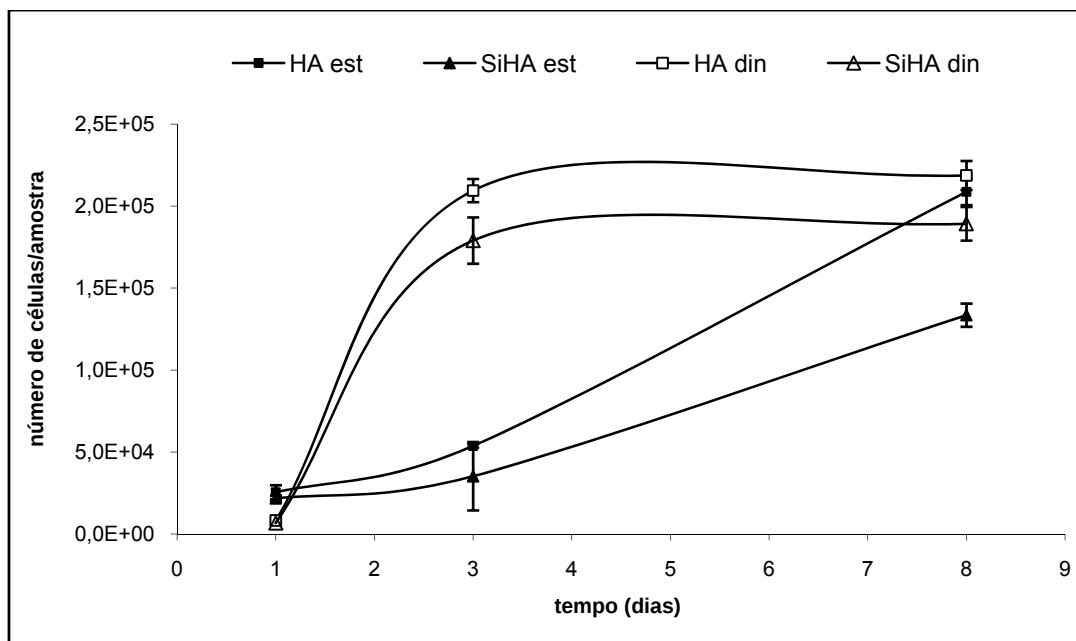


Figura V. 29 - Perfil de crescimento das células SaOs2 ao longo do tempo sobre as superfícies HA e SiHA sob condições estática e dinâmica.

(b) Diferenciação celular (atividade de fosfatase alcalina)

A Figura V.30 apresenta número de moles de fosfatase alcalina (ALP), uma enzima marcadora da atividade das células osteoblásticas, encontrado após 8 dias de cultivo sobre as superfícies de HA e SiHA sob condições estática e dinâmica. Para ambas as superfícies a atividade de ALP é mais evidente sob condição dinâmica, possivelmente devido à constante renovação do meio, possibilitando maior nutrição para as células, assim como o estudo apresentado por Wang e colaboradores (WANG *et al.*, 2003). Em ambas as condições de cultivo, a atividade desta enzima é maior para células cultivadas sobre superfícies de SiHA. Logo, o Si induz a diferenciação celular, assim como esperado, pois no tecido ósseo, este está presente no osteóide (osso primário ou embrionário), que normalmente é encontrado no esqueleto de fetos, nas placas de crescimentos e nos focos de consolidação de fratura (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

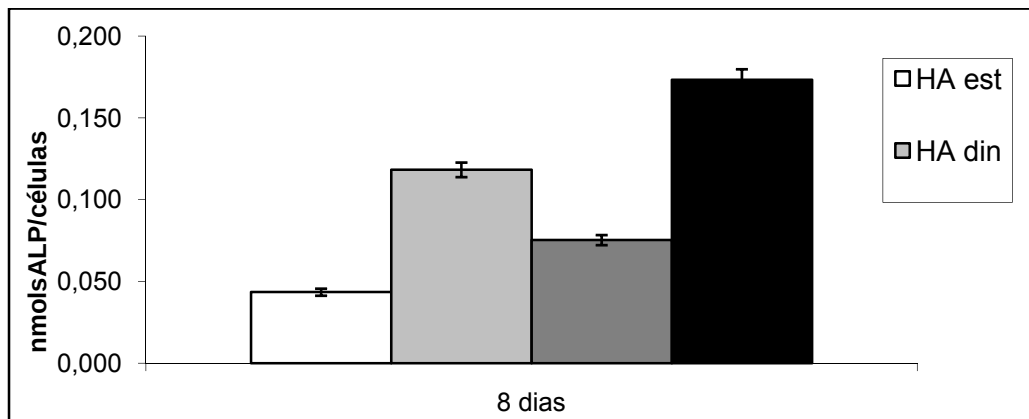
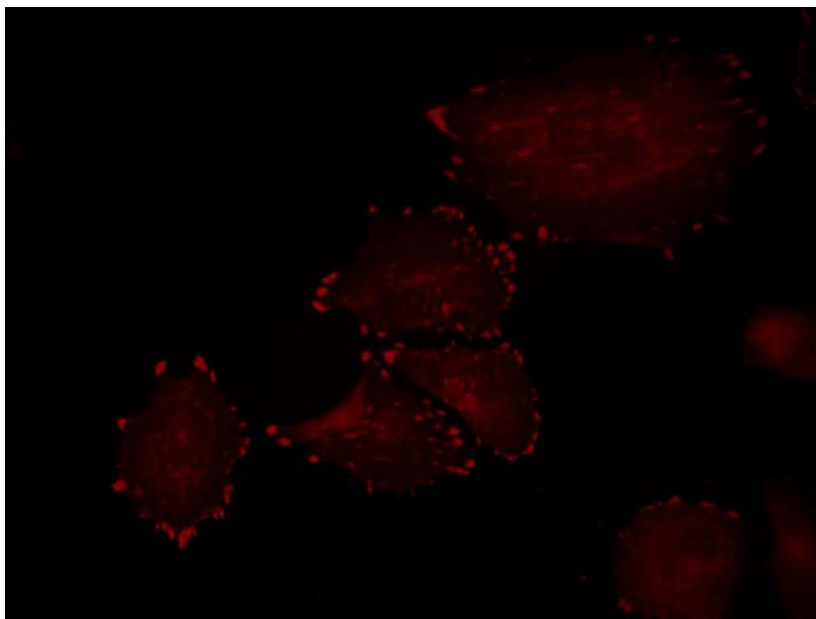


Figura V. 30 – Número de mols de fosfatase alcalina por célula após 8 dias de cultivo sobre as superfícies HA e SiHA sob condições estática e dinâmica.

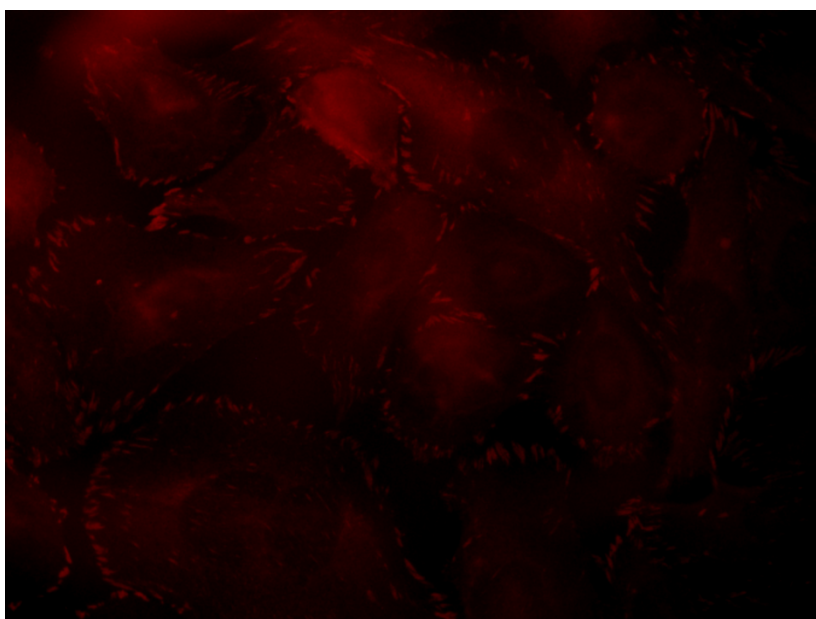
(c) Formação de contatos focais e fibras de tensão

A Figura V.31 apresenta contatos focais sobre superfície SiHA sob condições estática e dinâmica, obtidos por imunomarcação de vinculina. Observa-se claramente que as células cultivadas sob condição dinâmica, Figura V.31 (b), apresentam uma maior quantidade dessa proteína, caracterizando a necessidade de maior adesão celular, devido à tensão cisalhante imposta pelo fluxo constante. A partir de análise de imagem, Figura V.32, é possível confirmar a maior comprimento dos pontos focais para células cultivadas sob condição dinâmica, sendo a maior frequência é próxima de 4,5 μm , enquanto que para condição estática, notam-se menores tamanhos.

(a)



(b)



100μm



Figura V. 31 - Imunomarcação da vinculina nas células cultivadas sobre as superfícies SiHA após 3 dias de cultivo sob condições (a) estática e (b) dinâmica.

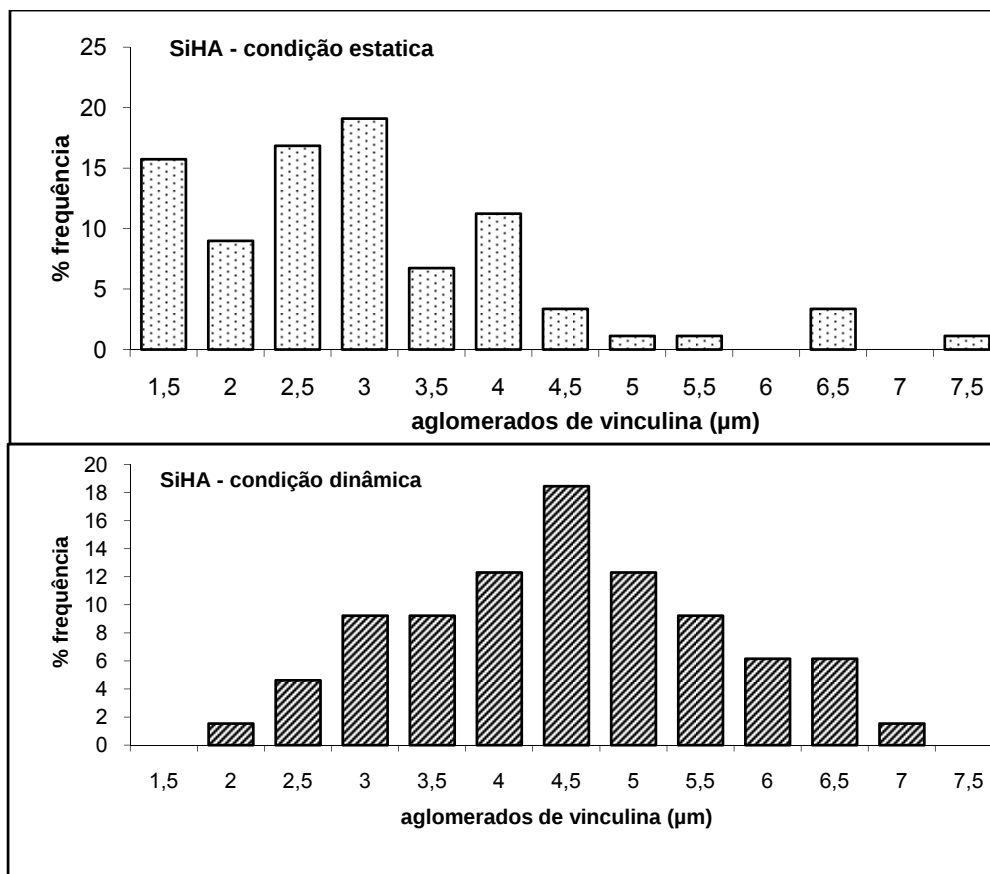
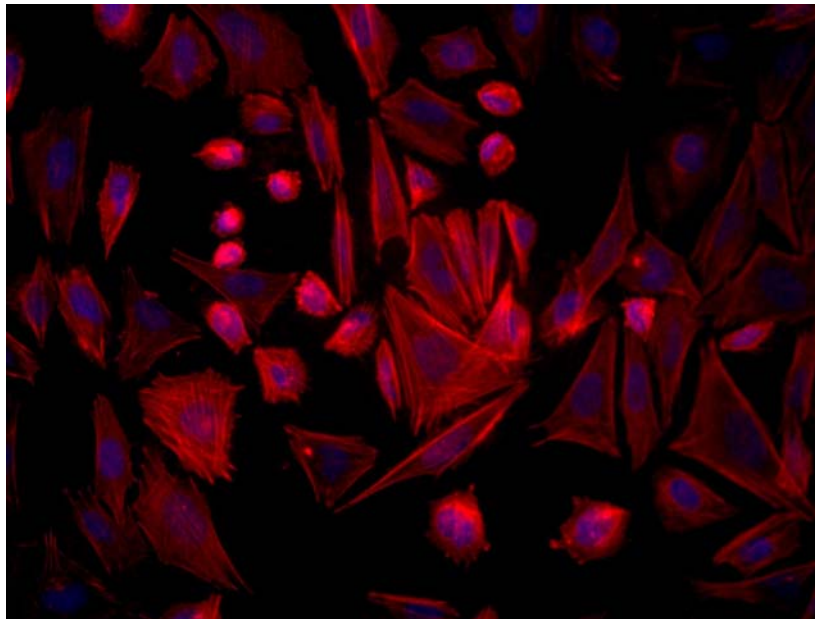


Figura V. 32 - Aglomerados de vinculina nas células cultivadas por 3 dias sobre de SiHA sob condições estática e dinâmica.

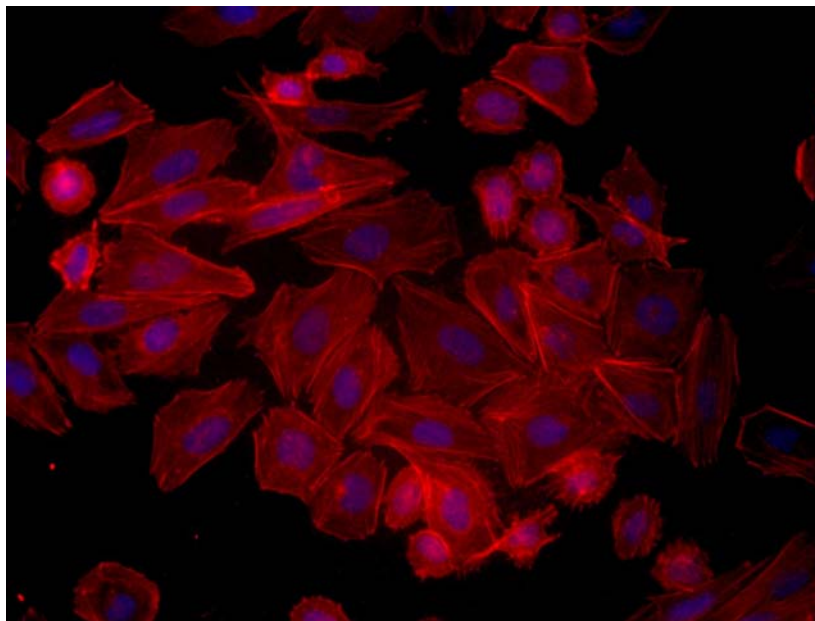
A Figura V. 33 apresenta fibras de tensão, que caracterizam a reorganização do citoesqueleto, marcadas em vermelho, e os núcleos marcados em azul, de células cultivadas sobre a superfície SiHA sob condições estática e dinâmica. Para condição dinâmica, Figura V. 33 b, as fibras de tensão apresentam-se de forma mais densa.

Por análise de imagem, foi obtida a área média das células cultivadas sobre SiHA sob condições estática e dinâmica, Figura V.34. Para 1 dia de cultivo, células cultivadas sob condição dinâmica apresentam maior área, enquanto que para 3 dias, não há diferença em função da condição de cultivo.

(a)



(b)



200 μm

Figura V. 33 - Marcação do DNA, apresentando o núcleo em azul, e F-actina por faloidina-TRIC (vermelho) nas células cultivadas por 3 dias sobre as superfícies SiHA sob condições estática e dinâmica

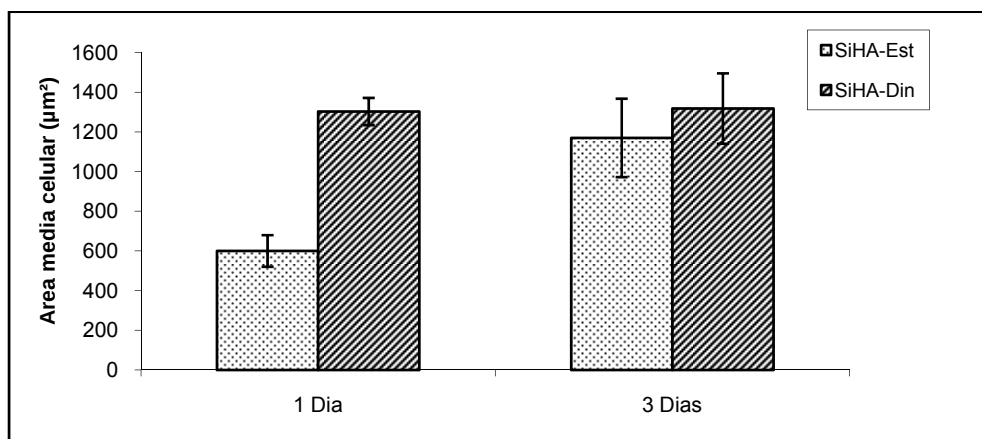


Figura V. 34 - Área média celular sobre as superfícies SiHA sob condições estática e dinâmica para 1 e 3 dias de cultivo.

A Tabela V.4 resume as principais respostas celulares, comparando-se as condições estática e dinâmica, sendo que foi possível perceber melhor a diferença entre os dois materiais com o uso dos testes dinâmicos .

Tabela V. 4 - Avaliação do cultivo celular sob condições estática (Est) e dinâmica (Din).

Avaliação celular	Resposta		
Proliferação - MTT		1 dia	Din = Est
		3 dias	Din > Est
	HA		Din = Est
	SiHA	8 dias	Din > Est
ALP			Din > Est
Contatos focais	SiHA		Din > Est
Fibras de tensão	SiHA		Din > Est
Area média celular	SiHA	1 dia	Din = Est
		3 dias	Din > Est

Resultados de cultura celular sob ambas as condições de cultivo, confirmam a importância da condição dinâmica, como estudo *in vitro*. O uso do biorreator torna as condições de cultivo ainda mais próximas da realidade da aplicação do material. Logo, a tensão aplicada pelo meio em conjunto com o maior transporte de massa são responsáveis por estimular a proliferação e diferenciação celular, assim como visto para cultura de células sobre superfície SiHA

VI. CONCLUSÕES

A avaliação biológica de pastilhas densas produzidas com hidroxiapatitas estequiométrica (HA) e substituída por silício (SiHA) apresenta as seguintes conclusões:

1) A caracterização dos pós de hidroxiapatitas estequiométrica (HA) e substituída com silício (SiHA) mostrou que os pós produzidos pelo método de precipitação por via úmida apresentam uma única fase associada à HA, não coexistindo outras fases. Resultados de EDS e FTIR confirmaram a presença do Si, provavelmente, em solução sólida na hidroxiapatita.

2) O estudo biomimético apresentou variações em função da composição das cerâmicas, do meio e da condição de cultura (estática ou dinâmica). A imersão de ambas as cerâmicas em meio não-completo sob condição estática induziu a dissolução e precipitação nas superfícies, enquanto que para imersão no meio completo, as superfícies foram menos modificadas, ficando cobertas com uma camada de proteína. A adsorção de proteínas foi maior na SiHA sob condição dinâmica.

3) Resultados obtidos após imersão sob condição dinâmica apresentaram uma aceleração do processo dissolução/precipitação em relação ao meio estático. Além disso, imersões sob esta condição induziram a precipitação de uma camada de apatita cálcio deficiente enriquecida por Mg.

4) A avaliação celular sob condição estática apresentou resultados pouco diferentes em função da química da superfície. As diferenças encontradas foram uma maior área celular após 3 dias de cultivo para HA e maior proliferação após 8 dias para SiHA.

5) A cultura celular sob condição dinâmica resultou em diferenças mais marcantes em função da química da superfície, sendo que para 8 dias de cultivo, células sobre a superfície SiHA apresentaram uma menor proliferação e maior atividade de fosfatase alcalina (ALP), em relação à superfície de HA.

6) Sob condição dinâmica, células cultivadas na superfície de SiHA resultaram em um processo de adesão mais rápido e contatos focais mais longos e finos. Além disso, o citoesqueleto apresentou diferença morfológica, devido à tensão de cisalhamento imposta pelo fluido.

VII. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Produzir uma hidroxiapatita substituída com silício e magnésio, simultaneamente.
- ✓ Avaliar adsorção de proteínas específicas, como Albumina e Fibronectina, nas superfícies das cerâmicas, após imersão de meio de cultura completo.
- ✓ Realizar dosagem de osteocalcina, proteína sintetizada apenas por células osteoblásticas, após 8 e 14 dias de cultura.
- ✓ Estudar o comportamento em longo prazo de osteoblastos aderidos sobre materiais cerâmicos sob condição dinâmica, chegando até os estágios de mineralização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T., 1990, "Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilising a biological process", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 1, pp. 536-540.
- ALBERTS, B.; JOHNSON; RAFF, M.; ROBERTS, K. et al., 2004, *Biologia Molecular da Célula*, Artmed, Porto Alegre.
- ANSELME, K., 2000, "Osteoblast adhesion on biomaterials", *Biomaterials*, v. 21, n. 7, pp. 667-681.
- ANSELME, K.; BIGERELLE, M., 2006a, "Modelling approach in cell/material interactions studies", *Biomaterials*, v. 27, n. 8, pp. 1187-1199.
- ANSELME, K.; BROUX, O.; NOEL, B.; BOUXIN, B. et al., 2002, "In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering", *Tissue Engineering*, v. 8, n. 6, pp. 941-953.
- ANSELME, K.; BIGERELLE, M., 2006b, "Effect of a gold-palladium coating on the long-term adhesion of human osteoblasts on biocompatible metallic materials", *Surface and Coatings Technology*, v. 200, n. 6325-6330.
- AOKI, H., 1991, *Science and medical applications of hydroxyapatite*, JAAS, Tokio.
- BENZARTI, K.; PERRUCHOT, C.; CHEHIMI, M. M., 2006, "Surface energetics of cementitious materials and their wettability by an epoxy adhesive", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 286, n. 1-3, pp. 78-91.
- BIGERELLE, M.; ANSELME, K.; DUFRESNE, E.; HARDOUIN, P. et al., 2002, "An unscaled parameter to measure the order of surfaces: a new surface

elaboration to increase cells adhesion", *Biomolecular Engineering*, v. 19, n. 2-6, pp. 79-83.

BIGI, A.; BOANINI, E.; CAPUCCINI, C.; GAZZANO, M., 2007, "Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals", *Inorganica Chimica Acta*, v. 360, n. 3, pp. 1009-1016.

BJERRE, L.; BUNGER, C. E.; KASSEM, M.; MYGIND, T., 2008, "Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds", *Biomaterials*, v. 29, n. 17, pp. 2616-2627.

BOTELHO, C. M.; BROOKS, R. A.; SPENCE, G.; LOPES, M. A. et al., 2006, "Differentiation of mononuclear precursors into osteoclasts on the surface of Si-substituted hydroxyapatite", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 78A, n. 709-720.

BOTELHO, C. M.; LOPES, M. A.; GIBSON, I. R.; BEST, S. M. et al., 2002, "Structural analysis of Si-substituted hydroxyapatite: zeta potential and X-ray photoelectron spectroscopy", *J.Mater.Sci.Mater.Med.*, v. 13, n. 12, pp. 1123-1127.

CACCIOTTI, I.; BIANCO, A.; LOMBARDI, M.; MONTANARO, L., 2009, "Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour", *Journal of the European Ceramic Society*, v. available online, n.

CAMPBELL, A. A., 2003, "Bioceramics for implants coatings", *Materials Today*, v. 26-31.

CANALIS, E.; HOTT, M.; DELOFFRE, P.; TSOUDEROS, Y. et al., 1996, "The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro", *Bone*, v. 18, n. 6, pp. 517-523.

CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B., 2005, *Células: uma abordagem multidisciplinar*, Manole, Barueri.

- CHOU, Y. F.; CHIOU, W. A.; XU, Y.; DUNN, J. C. Y. et al., 2004, "The effect of pH on the structural evolution of accelerated biomimetic apatite", *Biomaterials*, v. 25, n. 22, pp. 5323-5331.
- COMBES, C.; REY, C., 2002, "Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity", *Biomaterials*, v. 23, n. 13, pp. 2817-2823.
- COSTA E SILVA FILHO, F.; CONDE MENEZES, G., 2004, "Osteoblasts attachment and adhesion: how bone cells fit fibronectin-coated surfaces", *Materials Science and Engineering: C*, v. 24, n. 5, pp. 637-641.
- CRAIG, S. W.; JOHNSON, R. P., 1996, "Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents", *Current Opinion in Cell Biology*, v. 8, n. 1, pp. 74-85.
- DOS SANTOS, E. A.; FARINA, M.; SOARES, G. A.; ANSELME, K., 2006, "Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and b-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cells behavior", *In: 20th European Conference on Biomaterials. European Conference on Biomaterials*, v.
- ELLIOT, J. C., 1984, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, Elsevier, New York.
- GIBSON, I. R.; BEST, S. M.; BONFIELD, W., 1999, "Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite", *J.Biomed.Mater.Res.*, v. 44, n. 4, pp. 422-428.
- GIBSON, I. R.; BEST, S. M.; BONFIELD, W., 2002, "Effect of silicon substitution on the sintering and microstructure of hydroxyapatite", 85, pp. 2771-2777.
- GIBSON, I. R.; REHMAN, I.; BEST, S. M.; BONFIELD, W., 2000, "Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to beta-tricalcium phosphate", *J.Mater.Sci.Mater.Med.*, v. 11, n. 9, pp. 533-539.

- GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A.; LAQUERRIERE, P.; JALLOT, E.; NEDELEC, J. M. et al., 2006, "Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro", *Biomaterials*, v. 27, n. 17, pp. 3195-3200.
- GRAY J.J., 2004, "The interaction of proteins with solid surfaces", *Cur.Opin.Struc.Biol.*, v. 14, n. 110-115.
- HANKERMEYER, C. R.; OHASHI, K. L.; DELANEY, D. C.; ROSS, J. et al., 2002, "Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid", *Biomaterials*, v. 23, n. 3, pp. 743-750.
- HASHIZUME, M.; YAMAGUCHI, M., 1993, "Stimulatory Effect of Beta-Alanyl-L-Histidinato Zinc on Cell-Proliferation Is Dependent on Protein-Synthesis in Osteoblastic Mc3T3-E1 Cells", *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 122, n. 1, pp. 59-64.
- HENCH, L. L., 1998, "Biomaterials: a forecast for the future", *Biomaterials*, v. 19, n. 16, pp. 1419-1423.
- JAASMA, M. J.; PLUNKETT, N. A.; O'BRIEN, F. J., 2008, "Design and validation of a dynamic flow perfusion bioreactor for use with compliant tissue engineering scaffolds", *Journal of Biotechnology*, v. 133, n. 4, pp. 490-496.
- JALLOT, E.; NEDELEC, J. M.; GRIMAULT, A. S.; CHASSOT, E. et al., 2005, "STEM and EDXS characterisation of physico-chemical reactions at the periphery of sol-gel derived Zn-substituted hydroxyapatites during interactions with biological fluids", *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 42, n. 3-4, pp. 205-210.
- JUHASZ, J. A.; BEST, S. M.; AUFFRET, A. D.; BONFIELD, W., 2008, "Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum", *J.Mater.Sci.Mater.Med.*, v. 19, n. 4, pp. 1823-1829.

- KANNAN, S.; REBELO, A.; FERREIRA, J. M. F., 2006, "Novel synthesis and structural characterization of fluorine and chlorine co-substituted hydroxyapatites", *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 100, n. 10, pp. 1692-1697.
- KANNAN, S.; REBELO, A.; LEMOS, A. F.; BARBA, A. et al., 2007, "Synthesis and mechanical behaviour of chlorapatite and chlorapatite/beta-TCP composites", *Journal of the European Ceramic Society*, v. 27, n. 5, pp. 2287-2294.
- KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; DOS REIS, R. R.; ALVES, O. L., 2000, "Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar.", *Química Nova*, v. 23, n. 518-522.
- KAY, J. F., 1992, "Calcium phosphate coatings for dental implants", *Dental Clin.North Am.*, v. 36, n. 1, pp. 01-25.
- KISHI, S.; YAMAGUCHI, M., 1994, "Inhibitory Effect of Zinc-Compounds on Osteoclast-Like Cell-Formation in Mouse Marrow Cultures", *Biochemical Pharmacology*, v. 48, n. 6, pp. 1225-1230.
- KNABE, C.; KLAR, F.; FITZNER, R.; RADLANSKI, R. J. et al., 2002, "In vitro investigation of titanium and hydroxyapatite dental implant surfaces using a rat bone marrow stromal cell culture system", *Biomaterials*, v. 23, n. 15, pp. 3235-3245.
- LANDI, E.; CELOTTI, G.; LOGROSCINO, G.; TAMPIERI, A., 2003, "Carbonated hydroxyapatite as bone substitute", *Journal of the European Ceramic Society*, v. 23, n. 15, pp. 2931-2937.
- LEGEROS, R. Z., 1993, "Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics", *Clin.Mater.*, v. 14, n. 1, pp. 65-88.
- NAKANISHI, Z.; SAKIYAMA, T.; KOREYOSHI, I., 2001, "On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon", *J.Biosci.Bioeng.*, v. 91, n. 233-244.

- OKAZAKI, M., 1991, "Cristallographic behaviour of fluoridated hydroxyapatites containing Mg^{2+} and CO_2^{3-} ions", *Biomaterials*, v. 12, n. 9, pp. 831-835.
- OLIVEIRA, A. L.; MALAFAYA, P. B.; REIS, R. L., 2003, "Sodium silicate gel as a precursor for the in vitro nucleation and growth of a bone-like apatite coating in compact and porous polymeric structures", *Biomaterials*, v. 24, n. 15, pp. 2575-2584.
- PALARD, M.; CHAMPION, E.; FOUCAUD, S., 2008, "Synthesis of silicated hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(SiO_4)_x(OH)_{2-x}$ ", *Journal of Solid State Chemistry*, v. 181, n. 1950-1960.
- PATEL, N.; BEST, S. M.; BONFIELD, W.; GIBSON, I. R. et al., 2002, "A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules", *J.Mater.Sci.Mater.Med.*, v. 13, n. 12, pp. 1199-1206.
- PONSONNET, L.; REYBIER, K.; JAFFREZIC, N.; COMTE, V. et al., 2003, "Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour", *Materials Science and Engineering: C*, v. 23, n. 4, pp. 551-560.
- PORTER, A. E.; BEST, S. M.; BONFIELD, W., 2004, "Ultrastructural comparison of hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite for biomedical applications", *J.Biomed.Mater.Res A*, v. 68, n. 1, pp. 133-141.
- RAMESHBABU, N.; KUMAR, T. S. S.; PRABHAKAR, T. G.; SASTRY, V. S. et al., 2007, "Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 80A, n. 3, pp. 581-591.
- RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLANT, D., 2002, "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering", *Biomaterials*, v. 23, n. 1073-1080.

- ROHANIZADEH, R.; PADRINES, M.; BOULER, J. M.; COUCHOUREL, D. et al., 1998, "Apatite precipitation after incubation of bifasic calcium phosphate ceramic in various solutions: influence of seed species and proteins", *Journal of Biomedical Material Research*, v. 42, n. 530-539.
- ROUAHI, M.; CHAMPION, E.; HARDOUIN, P.; ANSELME, K., 2006, "Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials", *Biomaterials*, v. 27, n. 14, pp. 2829-2844.
- SHU, R.; MCMULLEN, R.; BAUMANN, M. J.; MCCABE, L. R., 2003, "Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts", *J.Biomed.Mater.Res A*, v. 67, n. 4, pp. 1196-1204.
- TAMM, T.; PELD, M., 2006, "Computational study of cation substitutions in apatites", *Journal of Solid State Chemistry*, v. 179, n. 5, pp. 1581-1587.
- THIAN, E. S.; HUANG, J.; BEST, S. M.; BARBER, Z. H. et al., 2006, "The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films", *Biomaterials*, v. 27, n. 13, pp. 2692-2698.
- VALLET-REGI, M.; ARCOS, D., 2005, "Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants", *Journal of Materials Chemistry*, v. 15, n. 15, pp. 1509-1516.
- WANG, Y.; UEMURA, T.; DONG, J.; KOJIMA, H. et al., 2003, "Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials", *Tissue Eng*, v. 9, n. 6, pp. 1205-1214.
- YANG, Y.; KIM, K. H.; ONG, J. L., 2005, "A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process--an alternative to plasma spraying", *Biomaterials*, v. 26, n. 3, pp. 327-337.

YAO, F.; LEGEROS, J. P.; LEGEROS, R. Z., 2009, "Simultaneous incorporation of carbonate and fluoride in synthetic apatites: Effect on crystallographic and physico-chemical properties", *Acta Biomater.*, v. 5, n. 6, pp. 2169-2177.

YONGLI, C.; XIUFANG, Z.; YANDAO, G.; NANMING, Z. et al., 1999, "Conformational changes of fibrinogen adsorption onto hydroxyapatite and titanium oxide nanoparticles", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 214, n. 38-45.