

Ministério da Saúde
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL
HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**SÍNTESE DE FOSFATOS DE CÁLCIO DOPADOS COM ÍONS FERRO A
PARTIR DA CASCA DO OVO DE GALINHA**

Luiz Claudio Silva Gomes

Rio de Janeiro
2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

G633s Gomes, Luiz Claudio Silva.

Síntese de fosfatos de cálcio dopados com íons ferro a partir da casca de ovo da galinha / Luiz Claudio da Silva gomes – 2018.

104 f. :Il.

Orientador: Diego Pinheiro Aguiar/Leonardo Rodrigues Andrade

Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) – Instituto Nacional de Traumatologia Jamil Haddad, Rio de Janeiro. 2018.

1. Fosfato de cálcio. 2. Íons ferro. 3. Osteointegração. 4. Substituto ósseo. 5. Casca do Ovo. 6. Dopagem.

CDD 540

SÍNTESE DE FOSFATOS DE CÁLCIO DOPADOS COM ÍONS FERRO A PARTIR DA CASCA DO OVO DE GALINHA

Luiz Claudio Silva Gomes

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-graduação em Ciências
Aplicadas ao Sistema Músculo esquelético
do Instituto Nacional de Traumatologia e
Ortopedia Jamil Haddad, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Orientadores: Prof. Dr. Diego Pinheiro Aguiar
Prof. Dr. Leonardo Rodrigues Andrade

Rio de Janeiro
2018

SÍNTESE DE FOSFATOS DE CÁLCIO DOPADOS COM ÍONS FERRO A PARTIR DA CASCA DO OVO DE GALINHA

Luiz Claudio Silva Gomes

Diego Pinheiro Aguiar

Leonardo Rodrigues Andrade

Dissertação de Mestrado submetida ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovada por:

Prof. Dr. José Carlos Pinto (COPPE - UFRJ)

Prof. Dr. Rubens Lincoln Santana Blazutti Marçal (IME)

Prof. Dr. João Antônio Matheus Guimarães (INTO)

Profa. Dra. Jamila Alessandra Perini Machado - Suplente (INTO)

Profa. Dra. Amanda dos Santos Cavalcanti (INTO)

Rio de Janeiro
Janeiro
2018

AGRADECIMENTOS

A execução deste trabalho não seria possível sem a participação de muitas pessoas que se colocaram à disposição para ajudar. Para tanto, meus sinceros agradecimentos vão para: O Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia e aos professores Dr. João Matheus e Dra Maria Eugênia pela oportunidade de estudar, aprender e convívio com a equipe de cirurgiões e pesquisadores; a Biomédica Rhayra Braga por toda ajuda e pela oportunidade de aprendizado; a bióloga Gabriele Ribeiro pelos ensinamentos em técnicas de cultura celular; o farmacêutico Gabriel, pelo convívio, amizade e suporte; ao Dr. Vinicius Magno da Rocha pelos ensinamentos e amizade, as professoras Amanda Cavalcanti, Anne Elise Fortuna, Ana Carolina Leal, Rafaela Sartore pela interminável disponibilidade e ensinamentos; a estagiária Barbara Simonson pelo convívio e parceria; a técnica em laboratório Cristiane por todo o convívio, disponibilidade e ensinamentos; a equipe de limpeza do INTO que sempre garantiu ótimas condições para a execução das atividades.

Agradeço igualmente aos:

Prof Marcos Lopes do Instituto de Macro Moléculas (UFRJ), por permitir utilizar as dependências do instituto e ao técnico Wellington pela disponibilidade e ensinamentos.

Professores Marcos Farina e Leonardo Andrade (ICB-UFRJ) por me permitirem utilizar as dependências do laboratório, pelos ensinamentos, orientação e disponibilidade.

Professores Carlos Nelson Elias e Marcelo Prado do Instituto Militar de Engenharia, pelos ensinamentos.

A Dra Ana Carolina Crema pela imediata disponibilidade e apoio nas análises.

Professores Rubens Marçal, Daniel Navarro e Jeison Lopes dos Santos do Instituto Militar de Engenharia pelo excepcional convívio e ensinamentos.

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) em nome dos professores Alexandre Rossi e Sílvia Albuquerque por absolutamente tudo o que fizeram por mim.

Professora Juliana Fonseca do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro por toda a ajuda e ensinamentos.

Professor Rodrigo Gonçalves do instituto de Química da PUC-Rio pela gentileza na realização das análises por absorção atômica.

Meus orientadores Diego Aguiar e Leonardo Andrade pela oportunidade de aprender e crescer profissionalmente.

Francisco Pinho, Marcio Babula e Fernando Leite da empresa Protwork pela compreensão, incentivo, amizade e suporte financeiro.

EPÍGRAFE

*“Talvez não tenha feito o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse
feito. Não sou o que deveria ser,
mas graças a D-us, não sou o que
era antes”.*

Martin Luther King

Agradeço em especial à minha mãe Antônia Iracema, ao meu sogro Antônio Annes e à minha sogra Barbara Guilhon, por todo o suporte dado ao longo destes anos. Da mesma forma dedico este trabalho à minha esposa Amanda Annes e aos meus filhos Isaac e Dora por se tornarem minha fonte de inspiração e coragem!

RESUMO

GOMES, Luiz Claudio Silva. Síntese de Fosfatos de Cálcio Dopados com Íons Ferro a Partir da Casca de Ovo da Galinha. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Músculo Esquelético) – Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2017.

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial e a expressiva incidência de lesões do sistema músculo esquelético, tanto o setor público como o privado buscam melhorias em seus produtos e processos de forma a contribuir com a saúde da população. Em relação às lesões associadas a perdas ósseas, há diversas indicações para utilização de substitutos ósseos onde, reconhecidamente o enxerto do próprio paciente (autólogo) é considerado padrão ouro. No entanto, em função de sua limitada área doadora, dos riscos associados à sua obtenção, dos custos adicionais para o sistema de saúde e do desconforto do paciente, a utilização de substitutos ósseos sintéticos é considerada uma alternativa. O presente trabalho visa à produção de um substituto ósseo cerâmico sintético utilizando a casca do ovo da galinha do consumo doméstico como fonte de íons cálcio introduzindo em sua estrutura diferentes concentrações (5%, 10%, 15% e 20% em mol) de íons ferro, com o intuito de produzir um composto inorgânico com propriedade bioativa. Após a sequência de reações químicas, processamento do composto e ensaios físico-químicos, verificou-se a obtenção de diferentes fases através das análises de difração de raios x com destaque para um ortofosfato duplo de cálcio e ferro $[\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7]$. A cultura de células MG63 sobre corpos de prova e o ensaio de viabilidade celular para cada grupo dopado analisado, revelou elevada compatibilidade das células com os compostos estudados, bem como ótimo perfil de adesão sobre a casca de ovo da galinha. Além disso, as imagens em microscopia eletrônica de varredura das células em contato com os compostos, mostraram que a superfície do material favoreceu a adesão celular. Portanto, os resultados demonstraram que a produção do composto é viável, obtendo-se a fase desejada para o fosfato duplo de cálcio e ferro para as reações de síntese com 10% e 15%mol do cátion trivalente, mas para a síntese envolvendo 20% em mol, ocorreu formação adicional da fase fosfato de ferro. Ressalta-se, no entanto, a presença da fase hematita para todas as reações mencionadas anteriormente e em relação ao aspecto biológico, os compostos produzidos apresentaram comportamento atóxico e não inerte, sugerindo-os como possíveis candidatos a substitutos ósseos.

Palavras-chave: Fosfato de cálcio duplo. Íons ferro. Casca do ovo da galinha. Substitutos ósseos. Dopagem.

ABSTRACT

GOMES, Luiz Claudio Silva. Synthesis of Iron Doped Calcium Phosphates from Chicken Eggshell. Rio de Janeiro, 2017. Master Thesis. (Master's Degree in Science Applied to the Musculoskeletal System) – National Institute of Traumatology and Orthopedics, Jamil Haddad, Ministry of Health, 2017.

With the increase in life expectancy of the world population and the significant incidence of lesions on musculoskeletal system, both public and private sectors seek improvements in their products and processes in order to contribute to population welfare. In relation to those lesions associated with bone loss, there are several indications for the use of bone substitutes where, admittedly, the patient's own (autologous) graft is considered a gold standard. However, because of its limited donor area, risks associated with obtaining it, additional costs for the health system and the patient's discomfort, the use of synthetic bone substitutes is considered an alternative. The present work aims the production of a synthetic ceramic bone substitute using the eggshell from domestic consumption as a source of calcium ions introducing different concentrations (5%, 10%, 15% and 20 mol%) of iron ions, with the intention of producing a bioactive inorganic compound. After the sequence of chemical reactions, compound processing and physico-chemical tests, different phases were obtained by X-ray diffraction analysis with emphasis on a double calcium iron phosphate $[\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7]$. MG63 cells were cultured on test specimens and the cell viability assays were performed for each doped group analyzed, verifying high cell compatibility with the studied compounds, as well as a good adhesion profile on the chicken's eggshell. In order to evaluate the cytotoxicity profile, scanning electron microscopy images of cells in contact with the compounds, showed that material surface favored cell adhesion. Thus, the results demonstrated that the production of the compound is viable, obtaining the desired phase for double calcium iron phosphate $[\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7]$ for the synthesis with 10% and 15%mol of trivalent cation, but for the reaction with 20%mol there was an additional phase, the iron phosphate. However, for the reactions with 10%, 15% and 20%mol, it was observed the formation of hematite (Fe_2O_3) as well. With regard to biological aspect, all the compounds showed atoxic and non-inert behavior during *in vitro* assays suggesting them as candidates for bone substitutes.

Keywords: Double calcium phosphates, Iron ions, Chicken eggshell, Bone substitutes, doping.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XIV-XV
LISTA DE FIGURAS	XVI-XVII
LISTA DE QUADROS E TABELAS	XVIII
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Os materiais em perspectiva histórica.....	19
1.2 As eras da humanidade e os materiais	19
1.3 Biomateriais.....	22
1.3.1 Biomateriais metálicos	23
1.3.2 Biomateriais poliméricos	25
1.3.3 Biomateriais compósitos	25
1.3.4 Biomateriais cerâmicos	27
1.3.5 Enxertos ósseos.....	28
1.4 Substitutos ósseos cerâmicos sintéticos.....	31
1.4.1 Hidroxiapatita	31

1.4.2 Beta tricalcio fosfato	33
1.5 Substituições iônicas	35
1.5.1 Metais monovalentes	36
1.5.2 Metais bivalentes	37
1.5.3 Metais trivalentes	38
1.5.4 Atividade biológica dos íons ferro	39
1.6 Casca do ovo da galinha	39
1.6.1 Componentes estruturais da casca do ovo da galinha.....	40
1.7 Tecido ósseo como alvo terapêutico	42
1.8 O setor econômico da saúde e os biomateriais	44
2. JUSTIFICATIVA.....	48
3. OBJETIVOS.....	49
3.1 Objetivo principal.....	49
3.2 Objetivos específicos	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Reagentes químicos	51
4.2 Fase I: preparo das COGs e síntese química	51
4.2.1 Preparo das COGs.....	51
4.2.2 Obtenção do nitrato de cálcio $[Ca(NO_3)_2]$	52

4.2.3 Síntese do fosfato de cálcio a partir da COG	54
4.2.4 Síntese do fosfato de cálcio cátion substituído	55
4.2.5 Processamento do material.....	56
4.2.6 Conformação mecânica e tratamento térmico.....	57
4.3 Caracterização físico-química.....	58
4.3.1 Difração de raios X.....	58
4.3.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	59
4.3.3 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	60
4.4 Ensaios biológicos	61
4.4.1 Ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i> - direto e indireto	61
4.5 Análise estatística.....	64
5. RESULTADOS.....	65
5.1 Difração de raios x	65
5.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	69
5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	74
5.4 Ensaios biológicos	77
5.4.1 Ensaio indireto de citotoxicidade	77

5.4.2 Ensaio direto e avaliação morfológica das células MG63	79
6. DISCUSSÃO	83
6.1 O preparo da casca do ovo	83
6.2 Difração de raios X.....	84
6.3 Dopagem com íons ferro	85
6.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	88
6.5 Análise morfológica por MEV	90
6.6 Ensaio indireto de citotoxicidade	91
6.7 Ensaio direto de citotoxicidade	93
7. CONCLUSÕES	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α -TCP	Alfa tricálcio Fosfato
β -TCP	Beta tricalcio fosfato
ABIMO	Associação Brasileira da Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos e Odontológicos
ALP	Fosfatase alcalina
ANS	Agência Nacional de Saúde
BGLAP	Proteína Óssea Gama Carboxiglutamato
BSP	Sialoproteína óssea
CaSR	<i>Calcium sensing Receptor</i> (Receptor Sensível ao Cálcio)
cFos	Proto oncogene humano
COG	Casca de Ovo da Galinha
CollA1	Colágeno tipo 1
DC-STAMP	Proteína Transmembrana Específica de Células Dendríticas
DLx5	<i>Distal-Less homeobox 5</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMI	Dispositivos Médicos Implantáveis
DRX	Difração de Raios X
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> (Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos)
FOB	<i>Free on Board</i> (Livre a bordo – modalidade de comércio internacional)
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i> (Infravermelho por Transformada de Fourier)
HAP	Hidroxiapatita

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
ISO	<i>International Standardization Organization</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MITF	Fator de Transcrição Associado à Microftalmia
MnSOD	Manganês Superóxido Dismutase
NCM	Nomenclatura Comum Mercosul
NFATc1	Fator Nuclear de Células T ativadas
OCN	Osteoconectictina
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
Osx	<i>Osterix</i>
PTH	Paratormônio
PU.1	Fator de transcrição PU.1
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Kappa b nuclear
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Runx-2	Fator de Transcrição Relativo ao Runx
SUS	Sistema Único de Saúde
TCP	Tricalcium phosphate (tricalcio fosfato)
TGF- β	Fator de crescimento Transformador beta
TRAP	Fosfatase Ácida Tartarato Resistente
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)
VEGF	Fator de crescimento Vascular Endotelial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Descoberta arqueológica de múmia com prótese de dedo feita em madeira	21
Figura 2 Tipos de implantes metálicos utilizados em cirurgias ortopédicas	23
Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura de compósito de hidroxiapatita-grafeno recobrimdo substrato metálico em titânio	26
Figura 4 Hidroxiapatita. (A) Distribuição dos átomos ao longo dos eixos <i>a,b,c</i> da célula unitária (B).....	32
Figura 5 Microscopia Eletrônica de Varredura do β -TCP	35
Figura 6 Componentes estruturais da casca do ovo	40
Figura 7 Microscopia eletrônica de varredura da casca do ovo	41
Figura 8 Níveis estruturais do tecido ósseo	42
Figura 9 Distribuição regional complexo industrial da saúde	47
Figura 10 Desenho experimental do estudo	50
Figura 11 Casca de ovo da galinha triturada após limpeza	52
Figura 12 Processo de obtenção do nitrato de cálcio a partir da casca do ovo da galinha	53
Figura 13 Síntese dos fosfatos de cálcio dopados com ferro	55
Figura 14 Corpos de prova de fosfatos de cálcio dopados obtidos a partir da COG	57
Figura 15 Difratoograma de raios X do β -TCP	59
Figura 16 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier de β -TCP magnesiana	60
Figura 17 Difratoograma de raios X de carbonatos de cálcio a partir da casca do ovo da galinha.....	65
Figura 18 Difratoograma de raios X do beta tricalcio fosfato obtido a partir da casca de ovo da galinha	66
Figura 19 Difratoograma de raios X da amostra dopada com 5% mol de ferro.....	67
Figura 20 Difratoograma de raios X da amostra dopada com 10% mol de ferro.....	68
Figura 21 Difratoograma de raios X da amostra dopada com 15% mol de Ferro.....	69

Figura 22 Difratoograma de raios X da amostra dopada com 20% mol de ferro	69
Figura 23 Análise por Infravermelho do fosfato de cálcio não dopado	70
Figura 24 Análise por infravermelho da amostra dopada com 5% mol de ferro	71
Figura 25 Análise por Infravermelho da amostra dopada com 10% mol de ferro	72
Figura 26 Análise por infravermelho de uma amostra dopada com 15% mol de ferro	73
Figura 27 Análise por Infravermelho da amostra dopada com 20% mol de ferro	74
Figura 28 Microscopia eletrônica de varredura das pastilhas de fosfato de cálcio dopadas com ferro	75
Figura 29 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	76
Figura 30 Ensaio de viabilidade celular por redução do MTT	77
Figura 31 Fotomicrografia da cultura de células MG63 tratadas com os meios DMEM expostos aos fosfatos de cálcio dopados	78
Figura 32 Microscopia eletrônica de varredura de cultura celular sobre as superfícies da casca do ovo	79
Figura 33 Microscopia Eletrônica de varredura da casca do ovo nas superfícies externa e interna após tratamento com hipoclorito de sódio	80
Figura 34 Cultura celular sobre um corpo de prova de fosfato de cálcio dopado com ferro 5% e 10% mol	81
Figura 35 Cultura celular sobre um corpo de prova de fosfato de cálcio dopado com ferro 15% e 20% mol.....	82
Figura 36 Estrutura tridimensional do fosfato de cálcio substituído com íons Ferro	86

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 Ligas metálicas usadas em próteses ortopédicas.....	24
Tabela 2 Polímeros utilizados em ortopedia.....	25
Tabela 3 Classificação dos enxertos quanto a origem.....	29
Tabela 4 Comparação das propriedades gerais dos enxertos ósseos	30
Tabela 5 Razão Ca/P dos Fosfatos de Cálcio	33
Tabela 6 Balança comercial brasileira - área da saúde.....	46
Tabela 7 Distribuição em massa para os grupos do ferro	56
Tabela 8 Análise semi-quantitativa das dopagens por EDS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os materiais em perspectiva histórica

Durante a evolução do homem na Terra, a busca pela sobrevivência e pelo alimento foi condição primordial para a manutenção da espécie. A vida nômade, necessária para busca de abrigo, fez com que percebessem que a caça era uma forma de alimentação e de proteção contra o frio, onde a fonte de energia era basicamente de proteína animal. Para esta atividade foi necessário o desenvolvimento de instrumentos de caça a partir de ossos de animais e até pedras. Algumas destas pedras, por ocasião das fogueiras, tanto para aquecimento do corpo, quanto para preparo dos alimentos, amoleciam e posteriormente, endureciam. Até mesmo outras pedras, menos resistentes na forma de pó, ganhavam consistência endurecida quando em contato com a água. Desta forma, o homem primitivo iniciou seus primeiros contatos com os materiais de origem natural (NAVARRO, 2006).

1.2 As eras da humanidade e os materiais

A relação do homem com os materiais é tão importante que as diferentes eras da antiguidade receberam nomes com base nos materiais mais significativos de cada época, como a Idade da Pedra até a Era dos Metais, passando pela Era Moderna e chegando à chamada Era do Silício, que marca os dias atuais (OLSON, 2001). De maneira resumida, o período da Idade da Pedra é marcado pelo aparecimento de diferentes tipos de utensílios produzidos pelo homem da época, como ferramentas para caça, até o início da era dos metais. Ao longo desta fase, os

Australoptecus foram os que desenvolveram as técnicas primitivas de manejo das pedras seguida pelo *Homo erectus* na produção de machados amolados, substituídos posteriormente por madeira e ossos de animais (NAVARRO, 2006). Ainda neste período, conhecido como paleolítico (2 milhões A.C. - 10.000 A.C.), o homem de neandertal e o cro-magnon foram os responsáveis por artefatos mais sofisticados para a época, tais como: instrumentos para raspar, instrumentos de pontas e lâminas cortantes feitas a partir de lascas de pedras. Entretanto, no período conhecido como Neolítico (10.000 A.C. – 6.000 A.C.), foi possível verificar no desenvolvimento da agricultura o surgimento da técnica de polimento da pedra, sendo, portanto, caracterizado como período da pedra polida (NAVARRO, 2006).

Os achados arqueológicos no Egito antigo apresentaram provas irrefutáveis da relação do povo antigo com materiais utilizados como substituintes de partes do corpo, quando uma múmia foi descoberta durante escavações realizadas por equipes do Instituto Alemão de Arqueologia. Acredita-se que esta múmia tenha vivido entre as 21^a e 22^a dinastias (1025-740 A.C.) e apresentava uma amputação do hálux direito. Na região, havia uma prótese de madeira com o intuito de manter a funcionalidade e estética do membro, sendo considerado um dos mais antigos registros encontrados, relacionando a utilização daquilo que nos dias atuais, classifica-se como biomateriais para medicina ortopédica regenerativa (**Figura 1**) (BRIER *et al.*, 2015).

Ainda na era do Neolítico, houve uma fase conhecida como Período da Argila. Esta fase da história recebe este nome em função do sedentarismo observado pelo homem primitivo, pois a agricultura nasce como forma de subsistência e o desenvolvimento de vasos cerâmicos para o transporte e armazenamento dos alimentos, marcaram este período. Outra característica importante, dada esta fase

mais sedentária, foi a construção de habitações utilizando argila e resíduo de vegetais para reforço estrutural, já que promoviam aglutinação, auxiliavam na secagem e distribuíam melhor as trincas que se formavam ao longo do processo de endurecimento (STEVANOVIC, 1997). Após este longo período da existência humana, inicia-se a era dos metais.

Textos especializados em arqueologia apontam divergências entre pesquisadores quanto ao início da chamada era dos metais e de certa forma da metalurgia. No entanto, o período que compreendeu de 4.550 a 4.000 anos A.C., foi dividido em Idades do Cobre, do Bronze e do Ferro (OLSEN e SHIPMAN, 1988). É interessante refletir sobre todas as teorias relativas ao início e fim destas fases, pois percebe-se que as técnicas em desenvolvimento de materiais já ocorriam, ainda que de forma rudimentar. Essa evolução tecnológica perdura até o fim da Idade do Ferro, quando se inicia a Idade do Aço, último período Islâmico, chamada Era Moderna (SHERBY e WADSWORTH, 2001).



Figura 1. Descoberta arqueológica de múmia com prótese de dedo feita em madeira. (Modificado de Brier *et al.*, 2015).

1.3 Biomateriais

Existem diferentes tipos de biomateriais divididos quanto a sua natureza química e propriedades relativas à resposta biológica. Quanto à natureza química os materiais podem ser classificados em: metais, polímeros, cerâmicos e os compósitos (PIRES *et al.*, 2015). Embora haja diferentes classificações para biomateriais, genericamente podem ser considerados como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos para aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural (RODRIGUES, 2013). No que tange à resposta biológica, os materiais são classificados como bioinertes, bioativos, reabsorvíveis (HOLZAPFEL *et al.*, 2013). Bioinertes, são aqueles que ao estarem em contato com o tecido biológico, causam pouca ou nenhuma resposta tecidual com predominância de tecido fibrótico. Os bioativos exercem papel estimulador de ligação ao tecido hospedeiro com pouca ou nenhuma presença de tecido fibrótico na interface material-tecido-hospedeiro. Por fim, os materiais reabsorvíveis são aqueles que são degradados e substituídos por tecido hospedeiro, mantendo o volume e a estabilidade mecânica ao longo do regeneração tecidual óssea (CRUZ, 2006).

Para que os diferentes tipos de biomateriais possam ser efetivos em suas aplicações, é fundamental que tenham o perfil de segurança bem estabelecido. Este perfil pode ser definido por um conjunto de ensaios denominados de ensaios de biocompatibilidade, considerados pré-requisitos para a realização de testes complementares, como os ensaios pré-clínicos e clínicos, até que se obtenha a aprovação governamental para uso em humanos (SERGEEVA *et al.*, 2014).

1.3.1 Biomateriais metálicos

Diversas ligas metálicas têm sido desenvolvidas no sentido de melhor atender às indicações na área da saúde. Propriedades específicas destas ligas, além da biocompatibilidade, a baixa taxa de corrosão, módulo de elasticidade, compressão, flexão, entre outras, podem definir suas aplicações em vários segmentos da medicina. Como exemplo desta classe de biomateriais, destacam-se as ligas de Cobalto-Cromo-Molibdênio (Co-Cr-Mo) e ligas de Titânio-Alumínio-Vanádio (Ti-6Al-4V) destinadas à produção de dispositivos ortopédicos implantáveis como as próteses de quadril e joelho, entre outros (LEWIS, 2013) (**Figura 2, A-D**).

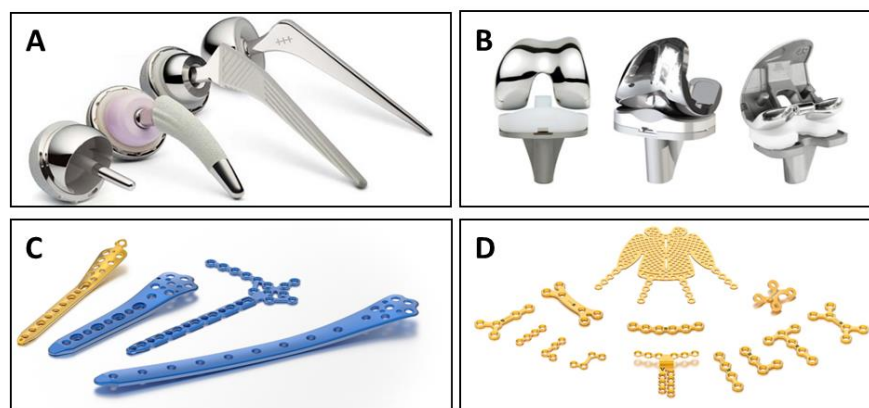


Figura 2. Tipos de implantes metálicos utilizados em cirurgias ortopédicas. Prótese de quadril (A), próteses de joelho (B), implantes para correção de fratura de ossos longos (C) e implantes para correção de fratura de ossos da face (Adaptado de www.cirurgiadoquadril.com.br).

Dentre as ligas metálicas utilizadas em diferentes ramos da medicina regenerativa, as ligas Ti6Al4V, 316L para o aço inoxidável e a Co-Cr-Mo para as ligas de cromo-cobalto são consideradas as mais representativas para uso clínico (**Tabela 1**) (LYNDON *et al.*, 2014). Muitas outras formulações de ligas encontram-se em etapas experimentais para verificação do conjunto de propriedades que possam atender às exigências clínicas (MANSUR *et al.*, 2012).

A síntese e o processamento da liga metálica do biomaterial, são requisitos fundamentais para o sucesso terapêutico quando da utilização destes. Desta forma, a baixa adesividade e proliferação celular na superfície de implantes metálicos para cirurgia ortopédica, poderiam levar a uma possível soltura do implante, comprometendo o resultado da cirurgia (ELIAS *et al.*, 2012).

Nos últimos anos muitos grupos de pesquisa no mundo têm se dedicado ao estudo das ligas de magnésio, como uma proposta de promover a fixação da fratura, permitindo que a liga metálica seja biodegradada ao longo do tempo (ZHAO, *et al.*, 2017; RADHA, SREEKANTH, 2017). A compreensão dos parâmetros estruturais, celulares e toxicológico é vital para que, em um futuro próximo, essas ligas metálicas estejam disponíveis para uso clínico.

Tabela 1. Ligas metálicas usadas em próteses ortopédicas (Adaptado de LYNDON *et al.*, 2014).

COMPOSIÇÃO	APLICAÇÃO
Ligas em titânio	
Puro Ti6Al4V Ti6Al7Nb Ti15Mo Ti12Mo6Zr2Fe Ti15Mo5Zr3Al	Artroplastias, implantes dentários, fixação de fraturas, etc.
Ligas em aço	
316 Rex 734 22-13-5 Tm Biodur Tm	Fixação de fraturas, implantes para coluna, etc.
Ligas em Co-Cr	
Co-Cr-Mo	Artroplastias de joelho, quadril, discos intervertebrais.

1.3.2 Biomateriais poliméricos

Os polímeros compreendem uma classe com alta representatividade nas mais diferentes áreas do setor econômico e na medicina, podendo apresentar diversas propriedades e aplicações. Os polímeros são classificados em dois grandes grupos, naturais e sintéticos, contudo há diversas outras maneiras de classificação dos polímeros que levam em conta as suas propriedades químicas específicas. Sendo assim, é possível elencá-los quanto ao número de monômeros, tipo de copolímero, tipo de cadeia, método de síntese, a sua organização da cadeia polimérica e sua fusibilidade (PIRES *et al.*, 2015) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Polímeros utilizados em ortopedia. (Modificado de LYNDON *et al.*, 2014)

COMPOSIÇÃO DOS POLÍMEROS	APLICAÇÃO
(polimetilmetacrilato)	Cimento ósseo em medicina e odontologia
Polietileno de ultra alto peso molecular	Componentes das substituições articulares
Copolímero do ácido polilático e poliglicólico	Suturas biodegradáveis, fixação de fraturas

1.3.3 Biomateriais compósitos

Conceitualmente os compósitos reúnem duas ou mais classes de materiais com estrutura e propriedade distintas em uma formulação, separados por uma interface a fim de promoverem combinações de propriedades para um determinado desempenho (MANSUR *et al.*, 2012). Existem diversos tipos de compósitos destinados às mais diversas indicações na área médica. Dentre eles, o titânio recoberto com um compósito de hidroxiapatita (composto cerâmico) - grafeno que

pode ser utilizado em implantes ortopédicos, entre outras possíveis aplicações (LIU *et al.*, 2014) (**Figura 3**).

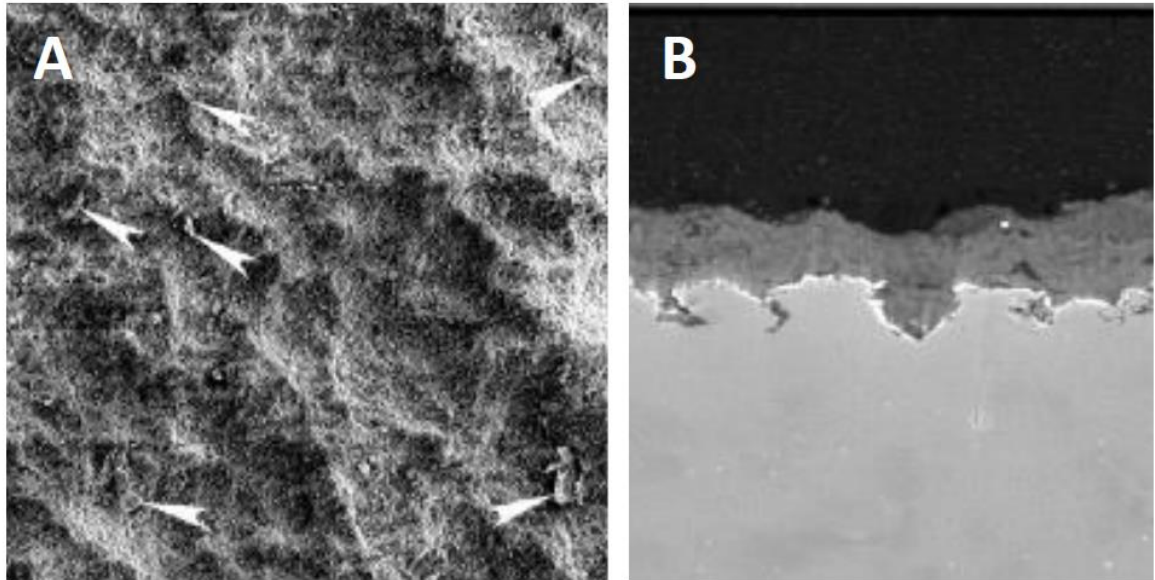


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de compósito de hidroxiapatita-grafeno recobrimo substrato metálico em titânio. Presença do grafeno (A e B) e recobrimento da hidroxiapatita como o compósito (B) (As cabeças de seta indicam a presença do grafeno) (substrato em titânio) (Adaptado de Liu *et al.*, 2014).

Um grande exemplo de compósito natural é o próprio osso, pois em sua constituição há um componente cerâmico, uma apatita deficiente em cálcio e um componente polimérico, uma matriz orgânica constituída principalmente de colágeno tipo I, diversificando suas propriedades mecânicas e biológicas (CAMPANA *et al.*, 2014).

1.3.4 Biomateriais cerâmicos

O biomaterial cerâmico é formado por compostos químicos inorgânicos, que em última análise são formados por elementos químicos da família dos metais e ametais, prevalecendo essencialmente as ligações do tipo iônica e, ou covalente. Possuem estrutura e propriedades diversas dentre seus compostos, apresentando-se como bons isolantes térmicos e elétricos, com alto ponto de fusão, elevada estabilidade química, além de apresentarem elevada dureza e fragilidade ao choque (SMITH e HASHEMI, 2006).

A investigação desses compostos cerâmicos no tecido ósseo data de meados do século XVI, quando identificou-se o fosfato de cálcio nos ossos, seguido pela elucidação da composição química dos componentes do tecido mineralizado. Da mesma maneira, em 1906, foi apresentada a primeira substituição iônica em fosfatos de cálcio conhecida hoje em dia como carbonato-apatita (revisado por ELIAZ e METOKI, 2017).

A utilização de compostos sintéticos, como o sulfato de cálcio hemi-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$), conhecido também como gesso de paris, ultrapassa 100 anos, quando os primeiros resultados em cirurgia ortopédica chegaram a conhecimento público (THOMAS *et al.*, 2005). A aplicação do sulfato de cálcio em cirurgia ortopédica abre um enorme leque de indicações, já que apresenta propriedade osteocondutora e ampla possibilidade de associação com outros substitutos e com antibióticos (VAN LIESHOUT e ALT, 2016).

Avanços tecnológicos na produção das biocerâmicas se intensificaram na década de 1970 com a Alumina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) e por volta dos anos 90 outras

biocerâmicas também ganharam evidência tais como o dióxido de titânio (TiO_2), a Zircônia (ZrO_2), os fosfatos de cálcio e as vitrocerâmicas (KAWACHI *et al.*, 2000). Dentre os biomateriais cerâmicos utilizados como substitutos ósseos, destacam-se a hidroxiapatita e o tricalcio fosfato.

1.3.5 Enxertos ósseos

As falhas ósseas representam um grande desafio para a medicina regenerativa, pois são inúmeros os fatores que levam a este tipo de problema, como fraturas causadas por acidentes automobilísticos, nas lesões por armas de fogo, lesões tumorais, revisões de artroplastias, entre outros (ZABEU e MERCADANTE, 2008).

Nos casos onde ocorram grandes perdas ósseas, não se espera que o processo natural de regeneração tecidual óssea seja efetivo, pois inúmeros são os fatores envolvidos. De maneira genérica, vale citar a necessidade de material osteoindutivo no local da lesão, a estabilidade mecânica do local da fratura e adequada vascularização do leito ósseo (MEEDER e EGGERS, 1994).

Considerando as primeiras abordagens com material autógeno da medicina moderna, vale citar que Seydel, em 1889, tratou uma lesão óssea de 20 cm utilizando fragmentos da tíbia de outro paciente. Além deste caso, outro importante marco histórico na traumatologia, foi o trabalho de Dobrotworski em 1910 que tratou lesões no crânio com fragmentos da costela de um paciente (MEEDER e EGGERS, 1994). Outro avanço no que diz respeito à utilização de enxertos ósseos remete ao trabalho de Albee em 1912, quando iniciou o armazenamento de enxertos ósseos utilizando técnicas rudimentares para conservação pela fervura das peças ósseas e

uso de soluções anti-sépticas. Essas técnicas evoluíram consideravelmente até que em 1951 o banco de tecidos da Marinha Americana utilizou um enxerto alogênico para uma cirurgia ortopédica (DUARTE e SHAEFFER, 2000). Estas técnicas continuam em pleno curso nos dias atuais, distinguidas conforme classificação geral dos enxertos ósseos (**tabela 3**).

Tabela 3: enxertos ósseos quanto à origem (FRIEDLAENDER, *et al.*, 2006).

TIPO DE ENXERTO	ORIGEM
Autoenxerto	De uma região anatômica para outra no mesmo indivíduo.
Aloenxerto	Transferência entre indivíduos geneticamente diferentes, mas da mesma espécie.
Xenoenxerto	Transferência a partir de uma espécie para um membro de outra espécie.
Isoenxerto	Transferência entre dois gêmeos homozigóticos.

Para que o preenchimento da falha óssea seja eficiente, seja pela utilização de um substituto natural ou sintético, este deverá apresentar um conjunto de características específicas que o classifica em uma ou mais das seguintes propriedades biológicas: osteogênico, osteocondutor, osteoindutor. Somente um tipo de substituto ósseo possui intrinsecamente todas estas propriedades, o enxerto ósseo autólogo (ORYAN *et al.*, 2014). Enxertos osteogênicos são aqueles que promovem crescimento ósseo pela transferência de osteoblastos viáveis em sua estrutura; os osteocondutores atuam como arcabouços permitindo suporte estrutural, adesão, diferenciação, proliferação celular e mineralização do tecido; os materiais osteoindutores promovem, por meio de estímulo proteico, a diferenciação de células indiferenciadas em células ósseas (PONTUAL e MAGINI, 2004). Já os enxertos

autólogos são os de osso esponjoso autólogo, aspirado de medula óssea, osso cortical autólogo e osso autólogo vascularizado (ARNER e SANTROCK, 2014).

Dentre os tipos de enxertos ósseos descritos na tabela 3, os autoenxertos e os aloenxertos apresentam propriedades muito importantes que devem ser analisadas para a tomada de decisão quando da necessidade de uso clínico (**tabela 4**).

Tabela 4: Comparação das propriedades gerais dos enxertos ósseos (FRIEDLAENDER, *et al.*, 2006)

TIPO DE ENXERTO	PROPRIEDADE DE MECÂNICA	OSTEO-CONDUÇÃO	OSTEO-INDUÇÃO	PROPRIEDADE OSTEOGÊNICA
Autoenxerto				
Esponjoso	+/-	+++	+++	+++
Cortical	+++	++	++	+
Aloenxerto				
Esponjoso	+/-	++	+	---
<i>Congelado</i>	---	++	+	---
<i>Congelado seco</i>				
Cortical				
<i>Congelado</i>	+++	+	+/-	---
<i>Congelado seco</i>	+	+	+/-	---
Desmineralizado	---	+	++	---
Alogênico				
Esponjoso	---	+	++	---

Face aos riscos e custos associados na utilização de materiais alógenos, bem como desconforto e potenciais complicações associadas à obtenção de material autólogo, a utilização de material sintético apresenta-se como alternativa (FRIEDLAENDER, *et al.*, 2006).

1.4 Substitutos ósseos cerâmicos sintéticos

A possibilidade de utilização de substitutos ósseos sintéticos, especialmente a classe dos ortofosfatos de cálcio, contribui para a elaboração de protocolos clínicos nas mais diversas indicações em falhas ósseas. No entanto, vale destacar as principais características de dois grandes representantes desta classe: a hidroxiapatita (HAP) e o tricálcio fosfato.

1.4.1 Hidroxiapatita

Entre as biocerâmicas, a HAP, ocupa posição de destaque por sua larga aplicação como substituto ósseo no campo da medicina regenerativa e da odontologia. A HAP é um fosfato de cálcio que tem composição e estrutura similares à fase mineral de ossos e dentes (**Figura 4**), apresentando excelente biocompatibilidade com tecidos duros e alto perfil osteocondutor, apesar de possuir baixa taxa de degradação e baixo potencial de osteoindução (DOROZHKIN, 2015).

Atualmente observa-se um maior número de estudos comparativos entre enxertos ósseos e compostos sintéticos. Segundo Robins *et al*, (2017) não houve diferença estatística entre grupos tratados com hidroxiapatita nanocristalina e enxerto autólogo na avaliação da fusão lombar entre grupos tratados

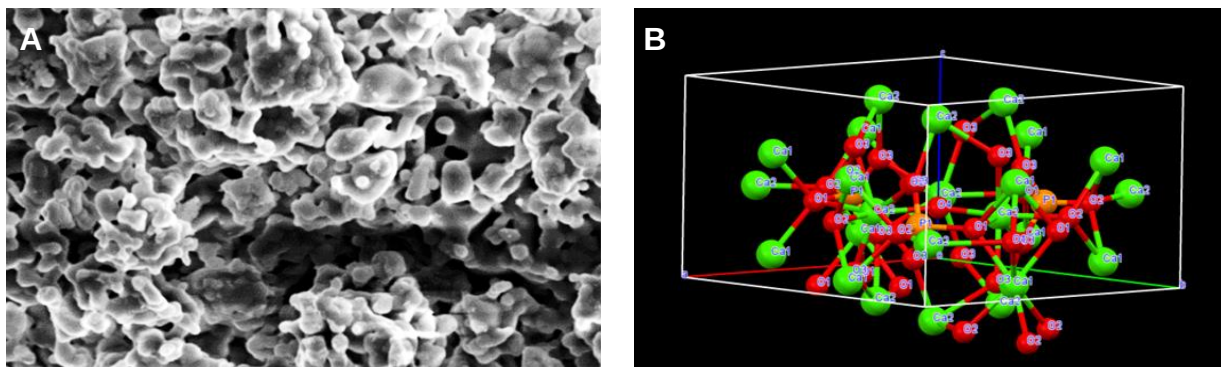


Figura 4. Hidroxiapatita. (A) Microscopia eletrônica de varredura de aglomerado de hidroxiapatita sinterizada a 1100°C (Adaptado de AZEVEDO *et al.*, 2015). (B) Distribuição dos átomos ao longo dos eixos *a,b,c* da célula unitária. (Arquivo próprio. Software Mercury versão 3.6).

A HAP estequiométrica é formada pelos elementos químicos cálcio (Ca), fósforo (P), oxigênio (O) e hidrogênio (H), arranjados conforme mostra sua fórmula, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. O fósforo e o oxigênio formam o grupo Fosfato (PO_4^{3-}) e grupo Hidroxila (OH^-) é constituído pela ligação entre o oxigênio e o hidrogênio (HAIDER, *et al.* 2017). Esses grupos juntamente com o cálcio distribuem-se espacialmente segundo um arranjo hexagonal compacto, constituindo regiões viáveis para a ocorrência de substituições, podendo alterar propriedades específicas do material (CAZALBOU, *et al.*, 2004).

A razão entre cálcio e fósforo (Ca/P) é um indicativo de solubilidade do material. Sendo assim, quanto maior a relação Ca/P, menor será sua solubilidade (GUASTALDI e APARECIDA, 2010). Esta solubilidade é um importante fator, pois relaciona-se diretamente com a degradação do material e desta maneira, com sua bioatividade. Em termos de mecanismo de ação, a atividade *in situ* dos fosfatos de cálcio ocorre pela liberação de íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} no ambiente, promovendo saturação do fluido corpóreo presente e ocasionando precipitação de uma apatita carbonatada com incorporação de íons Mg^{2+} , Na^+ e CO_3^{2-} , além de proteínas e

outros compostos inorgânicos na estrutura do precipitado (MANTRIPRAGADA *et al.*, 2013). Tanto a HAP quanto o composto β -TCP apresentam um conjunto de características, que os enquadram como substitutos ósseos sintéticos com marcante bioatividade¹ (AOKI, 1991) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Razão Ca/P dos Fosfatos de Cálcio (Retirado de: AOKI,1991)

FOSFATOS DE CÁLCIO	FÓRMULA QUÍMICA	Ca/P
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \text{OH}_2$	1,67
Fosfato de cálcio Amorfo	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato Tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato Octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogeno fosfato de cálcio	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogeno fosfato de cálcio	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio di-hidratado	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato Heptacálcico	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-idrogenofosfatotetracálcico	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfatomonocálcico mono-hidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

1.4.2 Fosfato Tricálcico

O Fosfato tricálcico (β -TCP) apresenta-se como um outro importante membro da família dos fosfatos de cálcio, com microestrutura romboédrica, permitindo que ocorram substituições em sua estrutura por diversos complexos e metais, como o chumbo (Pb^{+2}), cádmio (Cd^{+2}), cobre (Cu^{+2}), zinco (Zn^{+2}), estrôncio (Sr^{+2}), cobalto (Co^{+2}), ferro (Fe^{+3}), flúor (F^-), cloro (Cl^-), além dos grupos carbonatos (CO_3^{2-}) e vanadatos (VO_4^{3-}) (GUASTALDI e APARECIDA, 2010), sendo muito utilizado em

¹ Bioatividade: propriedade intrínseca aos biomateriais que se ligam ou aderem a tecidos vivos.

cirurgia crânio-maxilo-facial e ortopedia, em função de sua similaridade com a fase mineral dos ossos (TAVARES *et al.*, 2013). O TCP, possui formas alotrópicas² distintas para o composto tais como a α , α' , β . No entanto, não há interesse tecnológico para α' -TCP em função de sua instabilidade química durante a síntese (FRASNELLI e SGLAVO, 2016). Sua excelente biocompatibilidade bem como seu perfil de bioatividade, estão relacionados às propriedades físico-químicas, particularmente em relação à afinidade química do composto com a fase mineral do tecido ósseo que consiste de uma HAP cálcio-deficiente, incluindo na sua composição uma variedade de cátions e ânions como CO_3^{2-} , Mg^{2+} , F^- , Sr^{2+} , Cl^- , HPO_4^{2-} (LeGEROS, 1993).

Em relação ao perfil físico-químico do β -TCP, é importante destacar que as trocas iônicas entre grupamentos catiônicos e aniônicos do composto com o meio fisiológico são favorecidas, já que apresenta um perfil de solubilidade maior que o da HAP, o que pode influenciar no processo de reabsorção no microambiente. Desta forma, se neste composto houvesse perfil de solubilidade inadequado, as trocas iônicas ficariam dificultadas (RENAUDIN, *et al.*, 2017). Considerando otimizar a resposta biológica, o planejamento da síntese, bem como o entendimento de questões fundamentais sobre a estrutura do composto e topografia tornam-se necessários (**Figura 5**) (DAVISON *et al.*, 2014).

² Alotropia: Característica de um material que possui mais de uma estrutura cristalina, sendo dependente da temperatura e pressão.

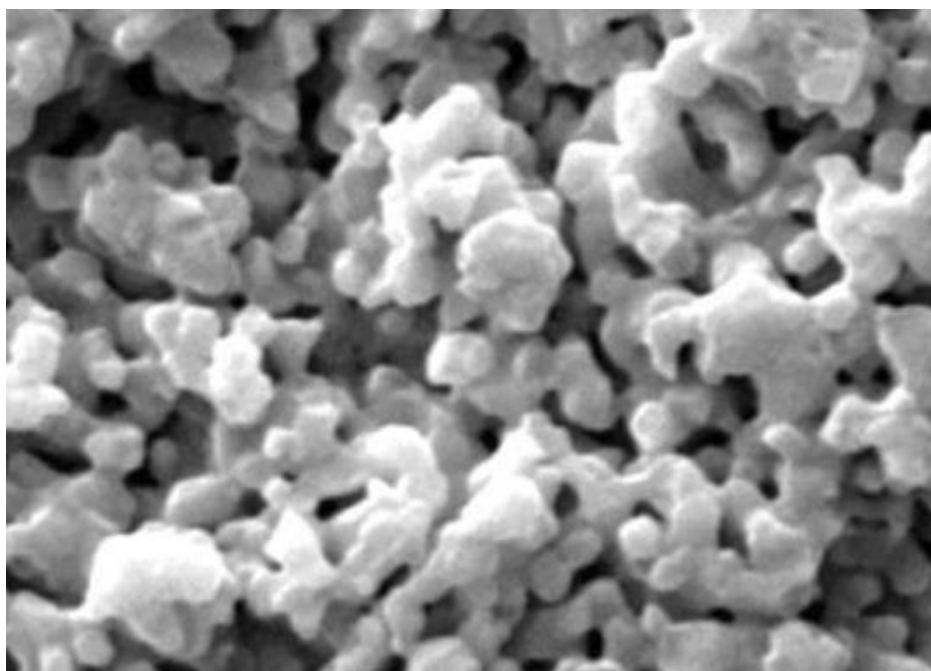


Figura 5. Microscopia Eletrônica de Varredura do β -TCP. Topografia de um corpo de prova cilíndrico após o processo de sinterização (Retirado de DAVISON *et al.*, 2014).

1.5 Substituições iônicas

Considerando os substitutos ósseos sintéticos, a família dos fosfatos de cálcio apresenta uma importante característica, a propriedade osteocondutora, pois permite a migração, adesão e proliferação de células formadoras de tecido ósseo sobre um arcabouço. No entanto, busca-se otimizar esta propriedade desenvolvendo um substituto ósseo sintético com propriedade osteoindutora pela inclusão de substituintes na rede cristalina dos substitutos ósseos (BOSE *et al.*, 2013). Logo, a técnica de substituição iônica incluindo elementos químicos como Si, Zn, Li, Mg, Mn e Sr em sítios específicos ou grupos na rede cristalina do TCP, pode afetar as propriedades físico-químicas do composto, bem como a atividade biológica mediada pelos diferentes tipos de cátions (BOSE e VAHABZADEH, 2017). Desta forma, estes

materiais poderiam assumir diferentes comportamentos, tais como bioinertes, bioativos e reabsorvíveis (PIRES *et al.*, 2015).

Os fosfatos de cálcio produzidos em laboratório, são classificados como substitutos ósseos osteocondutores sintéticos (GUTIERRES *et al.*, 2005). Neste sentido, os sintéticos como os fosfatos de cálcio, ganharam grande amplitude de utilização em função de apresentarem ótima biocompatibilidade e permitirem a adesão e proliferação de células ósseas. Como eles não apresentam propriedades osteoindutoras, muitos grupos de pesquisa na área de biomateriais vêm concentrando esforços para promover mudanças estruturais nos fosfatos de cálcio para que possuam, além da atividade osteocondutora, propriedade osteoindutora (ZILM *et al.*, 2016).

Apenas o grupo dos enxertos autólogos possuem as características biológicas ideais para um substituto ósseo. Todavia, apresentam também desvantagens para o doador, pois como se trata de um novo processo cirúrgico pode potencializar eventuais complicações como risco de infecções, dor crônica local, limitado volume a ser extraído da zona doadora, entre outras comorbidades geradas pela retirada do enxerto (BAUMHAUER *et al.*, 2014).

1.5.1 Metais monovalentes

A inclusão de cátions monovalentes (M^+) como sódio (Na^+), potássio (K^+), prata (Ag^+) e lítio (Li^+) na estrutura cristalina dos fosfatos de cálcio promove alterações nas propriedades do composto, desta forma quando realiza-se a substituição de cálcio na estruturas dos fosfatos pela prata, pretende-se obter a propriedade antibacteriana e no caso do lítio, proporcionar a osteogênese (BOSE *et*

al., 2013). Na atividade osteogênica, o lítio atua na inibição da GSK3, um regulador da via de sinalização WNT, que por sua vez está diretamente relacionada com a atividade proliferativa da célula óssea (CHEN *et al.*, 2007).

1.5.2 Metais bivalentes

Metais bivalentes (M^{2+}) tais como zinco (Zn^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), estrôncio (Sr^{2+}), cobre (Cu^{2+}) e cobalto (Co^{2+}), desempenham papel na regeneração tecidual óssea face à direta relação com a osteogênese e angiogênese. Dentre estes cátions citados, vale destacar a participação do zinco, magnésio e estrôncio (BOSE *et al.*, 2013). O zinco é um metal que atua no microambiente celular inibindo a atividade osteoclástica e concomitantemente estimula a atividade osteoblástica através da coativação de metaloproteínas (FIELDING *et al.*, 2012).

O magnésio é um elemento essencial e muito abundante no organismo humano. Tem sido descrito em estudos *in vitro*, que doses de magnésio estavam diretamente relacionadas a manutenção da função vascular via indução da síntese de óxido nítrico em células endoteliais, semelhante ao mecanismo de indução da angiogênese pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (BASRALI *et al.*, 2015; ZOU *et al.*, 2011).

O estrôncio, por sua vez, corresponde a 0,035% do conteúdo de íons cálcio presentes no esqueleto, melhorando o processo de regeneração óssea por dois mecanismos de ação. Acredita-se que a primeira via seja pela ativação dos receptores de cálcio (CaSR) nos osteoblastos, o que simultaneamente eleva a produção de osteoprotegerina (OPG) com consequente redução dos níveis de expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL)

(QUERIDO *et al.*, 2016). O segundo mecanismo de ação trata da osteoblastogênese, mediada pelo estímulo da produção do fator estimulador nuclear Tc (NFATc) e pela sinalização da via Wnt, reduzindo a expressão da esclerostina e ativando o receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) nos osteoblastos. Além disso, ocorre a ativação de vias de sinalização que controlam os sinais proliferativos como da fosforilação de PI3K, ERK1/2 e P38 que agem sobre na manutenção da homeostasia óssea (SAIDAK e MARIE, 2012).

1.5.3 Metais trivalentes

Há certa carência em trabalhos na literatura relacionando a atividade de substituintes trivalentes na estrutura cristalina de compostos cerâmicos com suas respectivas atividades biológicas *in vitro* ou *in vivo*. Entretanto, vale ressaltar que os íons traço presentes no tecido ósseo estão sob corrente investigação relacionando tanto seus aspectos físico-químicos, como os biológicos (SNEHA e SUNDARAM, 2015). Entre os metais trivalentes (M^{3+}), destacam-se alguns elementos como o boro (B^{3+}) atuando sobre a osteogênese e angiogênese através da regulação de fatores protéicos como o TGF- β e VEGF e ativação do fator de transcrição RUNX2 da via osteogênica (SALAZAR, 2015). O manganês ($Mn^{2+/3+}$) participa com implicações na via de sinalização do paratormônio (PTH), fator regulador chave para íons cálcio no metabolismo e com o efeito do MnSOD em neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS), já que estas espécies têm participação na osteoclastogênese (WAUQUIER *et al.*, 2009).

1.5.4 Atividade biológica dos íons ferro

O ferro ($\text{Fe}^{+2/+3}$), pertencente à família dos metais de transição da tabela periódica (grupo VIII), é o metal mais utilizado dentre todos os metais. Desde a fabricação do aço até as mais complexas reações do organismo. Sua importância biológica é pela participação em diversas funções dentre as quais destacam-se: transporte de oxigênio no sangue de mamíferos (hemoglobina), no armazenamento de oxigênio nos músculos (mioglobina), transporte de elétrons em plantas e animais (citocromos e ferredoxinas) e armazenamento e absorção de ferro (ferritina e transferrina) (LEE, 1999). Além destas ações na biologia dos seres vivos, os íons ferro têm sido investigados diretamente como proposta terapêutica face à propriedade magnética intrínseca de seus óxidos formados, como na terapia do câncer, promovendo hipertermia do tecido envolvido sob aplicação de um campo magnético (HE *et al.*, 2017). Especificamente no segmento ortopédico, observa-se uma evolução nas publicações científicas utilizando fosfatos de cálcio dopados com íons ferro não somente relacionados aos aspectos físicos e químicos, como o seu impacto na resistência mecânica e nos aspectos cristalográficos e também na formação de tecido ósseo (KABIR *et al.*, 2012).

1.6 Casca do ovo da galinha

A produção industrial de ovos em 2008 atingiu patamares de 62 milhões de toneladas, com isso a produção de cascas de ovos como resíduo sólido alcançou 6,82 milhões de toneladas (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Esta importante fonte natural de cálcio permite muitas possibilidades de uso, inclusive na produção de enxertos ósseos para uso em cirurgias ortopédicas (KUMAR *et al.*, 2012).

Macroscopicamente, o ovo está dividido em três regiões: a gema, clara ou albúmen e a casca (**Figura 6**).

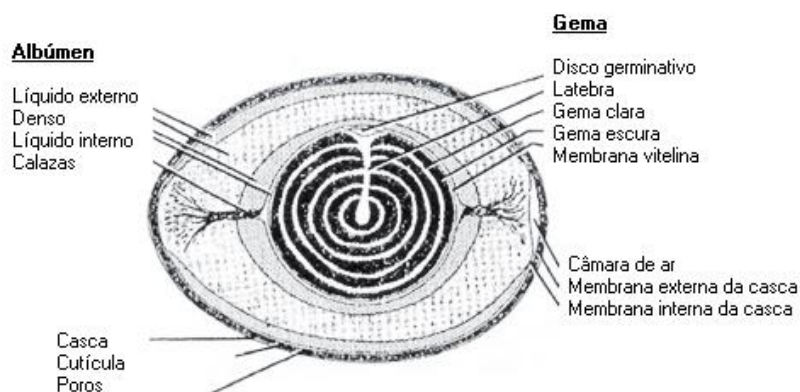


Figura 6. Componentes estruturais da casca do ovo. Adaptado de USDA (2000).

A composição da casca do ovo da galinha (COG), aproximadamente 11% do peso total do ovo, apresenta 94% de carbonato de cálcio, 1% de fosfato de cálcio, 1% de carbonato de magnésio, o que permite um amplo leque de aplicações desde a agricultura até o setor da saúde (WU *et al.* 2013). Além dos componentes inorgânicos presentes na COG, há aproximadamente 4% de material orgânico, como o colágeno, polissacarídeos sulfatados, entre outros (TSAI *et al.*, 2006).

1.6.1 Componentes estruturais da casca do ovo da galinha

A COG possui uma região mais externa conhecida como região cuticular, uma intermediária denominada de palisado e, na porção mais interna, a mamilar (KANG *et al.*, 2010). A região cuticular é insolúvel em água, possui extensão em torno de 10 a 30 μm e está acima de uma região porosa. É composta por uma região mais

interna mineralizada (hidroxiapatita carbonatada) e outra mais externa composta por matriz orgânica. Naturalmente, todo este conjunto tem como função, a proteção contra invasores externos como parasitas, insetos, bactérias, etc (DENNIS *et al.*, 1996). Avançando para seu interior, encontra-se uma segunda região conhecida como matriz da casca, essa é uma região mineralizada composta basicamente de calcita, forma mais estável de carbonato de cálcio. Está subdividida em outros dois segmentos: região conhecida como palisado formada pelos cristais de calcita organizados em colunas verticais e a camada mamilar atuando como uma reserva de íons cálcio (ARIAS *et al.*, 1993). Por fim, o nível mais interno da COG apresenta-se organizada tridimensionalmente em tripla camada, sendo composta principalmente de colágeno tipo X e que também funciona como uma barreira à mineralização (SOLEDADE FERNANDEZ *et al.*, 2001) (**Figura 7**).

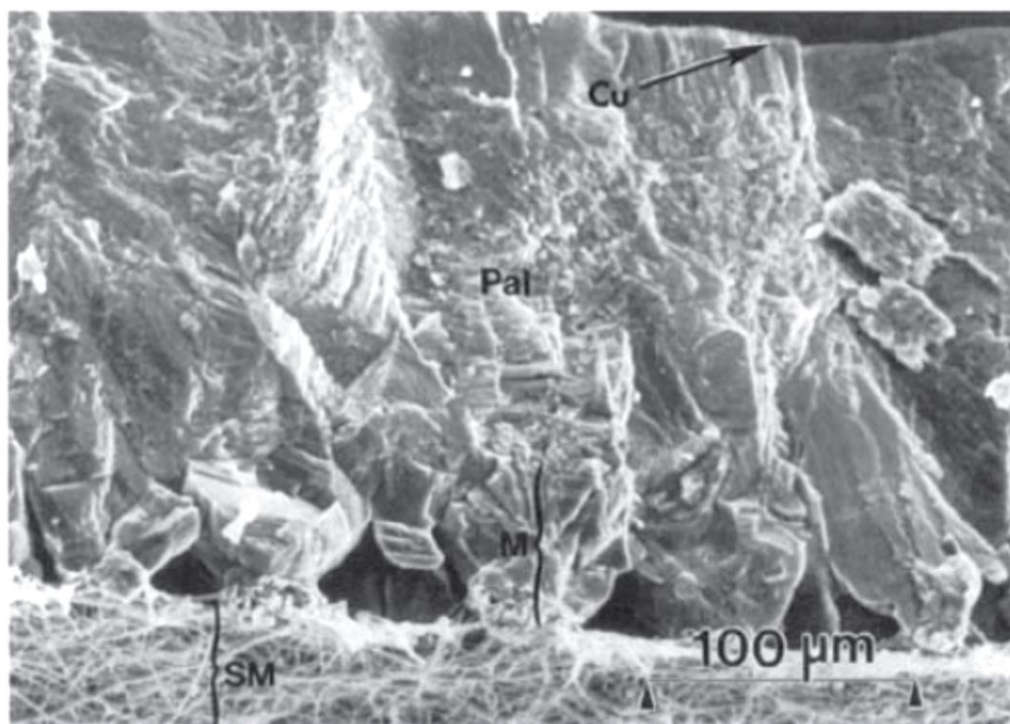


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura da casca do ovo. Região cuticular (Cu); região da palisado (Pal); mamilar (M) e membrana da casca (SM) (Modificado de Dennis *et al.*, 1996).

1.7 Tecido ósseo como alvo terapêutico

O tecido ósseo é composto de 70% de uma matriz inorgânica (fosfato de cálcio) e 30% de material orgânico, enquadrando-o na condição de um material compósito. O planejamento racional de substitutos ósseos sintéticos deve relacionar a indicação terapêutica, aspectos físico-químicos do biomaterial, considerando naturalmente todas as características do tecido hospedeiro, inclusive os níveis organizacionais de cada região do tecido ósseo durante seu desenvolvimento (LIBONATI e VERGANI, 2016) (**Figura 8**). Adicionalmente, devem possuir um perfil de reabsortividade adequado, permitindo que o composto sintético implantado degrade-se ao mesmo tempo em que é substituído pelo tecido natural hospedeiro (BOSE *et al.*, 2013).

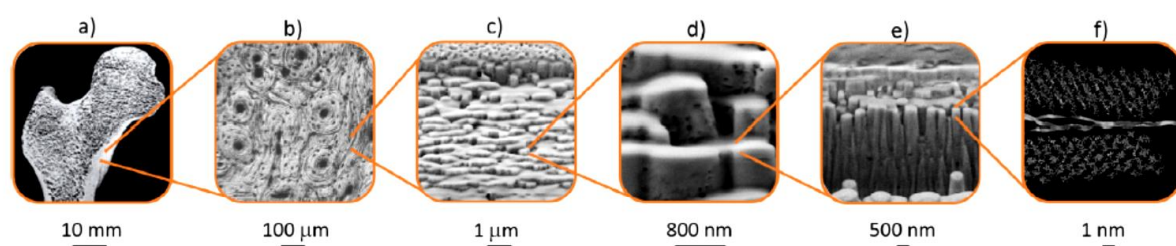


Figura 8. Níveis estruturais do tecido ósseo. (A) Osso humano em macro escala, considerando suas regiões cortical e trabecular. (B) Micro estrutura Harvesiana, formada por lamelas circunferenciais. (C) Região de aprisionamento dos osteócitos. (D) Aglomerados de fibras de colágeno. (E) Fibras mineralizadas de colágeno. (F) Tropocolágeno circundado por nanocristais de hidroxiapatita carbonatada (Modificado de LIBONATI e VERGANI, 2016).

A homeostase do tecido ósseo, assim como sua resposta ao trauma e às manipulações cirúrgicas depende das células ósseas e os três tipos celulares do tecido ósseo são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (KARSENTY, 2017). As células indiferenciadas possuem morfologia irregular, com núcleo único, poucas organelas e se mantêm quiescentes e indiferenciadas até que sejam

estimuladas a proliferar e diferenciar em osteoblastos, como ocorre ao longo do processo de reparo de uma fratura. Os osteoblastos residem na região perivascular e nas membranas que revestem o osso externamente chamadas de periósteo e nas membranas internas conhecidas por endósteo (BORGES; DE OLIVEIRA CALVET, 2015). Os osteoblastos são células derivadas da linhagem mesenquimal que apresentam potencial de diferenciação osteoprogenitor mediado pelos fatores de transcrição Runx-2, DLx5 e Osx. Estes fatores atuando como agentes de regulação positiva de outros genes fundamentais para o processo de diferenciação, como *CollA1*, *ALP*, *BSP*, *BGLAP*, *OCN* (BAILEY *et al.*, 2017; KARSENTY, 2017). Os osteoblastos correspondem a aproximadamente 4% a 6% das células presentes na estrutura óssea e, quando ativos, apresentam forma poliédrica ou ovalada. Configuram-se como células com atividade sintetizadora de proteínas possuindo processos citoplasmáticos que se estendem pela matriz osteóide em direção aos osteócitos, mantendo contato e comunicação com estes (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

Os osteoclastos estão entre as maiores células do corpo humano, sendo multinucleadas e com morfologia altamente irregular. Originalmente derivam de linhagem hematopoiética sob influência de vários fatores como Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos (M-CSF) secretado por células osteoprogenitoras e osteoblastos, bem como o RANK-L secretado por osteoblastos que formam o complexo RANK-RANK-L/Osteoprotegerina (OPG), favorecendo a osteoclastogênese, e em última análise o remodelamento ósseo (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). Esta interação promove a expressão subsequente de outros fatores osteoclastogênicos como o NFATc1 e DC-STAMP. Contudo a interação com fatores de transcrição como PU.1, cFOs, MITF e NFAT atuam regulando a

expressão de genes específicos para osteoclastos como TRAP e Catepsina fundamentais para a atividade osteoclástica (KOBAYASHI *et al.*, 2009).

Os osteócitos correspondem a aproximadamente 90% das células do esqueleto maduro. Estão envolvidos por uma matriz mineralizada e combinados com as células endosteais, atuando na homeostase do cálcio sérico, além de apresentarem um núcleo único, com número de organelas correspondente ao grau de atividade celular (WEI *et al.*, 2015). Apresentam prolongamentos citoplasmáticos longos que partem de seu corpo celular para contato com outras células da matriz óssea, que se estendem por mais de 90% da área total da matriz do osso maduro. Com isso, faz com que estas células tenham contato com toda a matriz mineralizada, participando no mecanismo de troca mineral entre o fluido ósseo e o sangue (AARDEN, *et al.*, 1994). A compreensão dos fatores que regulam a homeostasia do tecido ósseo é fator determinante para o aperfeiçoamento e desenvolvimento de tratamentos de doenças relacionadas ao sistema musculoesquelético.

1.8 O setor econômico da saúde e os biomateriais

O aumento da expectativa de vida da população mundial tem sido observada e estudos mostram que até 2030 haverá um incremento na ordem de 65% e 85% para mulheres e homens, respectivamente, culminando em faixas etárias acima dos 85 anos (KONTIS *et al.*, 2017). O Brasil atingirá o patamar de 210 milhões de habitantes em 2020 e neste sentido, a taxa de envelhecimento continuará avançando e o país alcançará 76,5 idosos para cada 100 jovens aproximadamente (IBGE, 2017). Em termos absolutos, serão 30,7 milhões de pessoas com mais de 60

anos (BODSTEIN, *et al.*, 2014). Com esta tendência, tanto a indústria na área da saúde quanto as universidades, caminham no sentido de pesquisar, desenvolver e produzir dispositivos médicos, que possam atender as demandas, como peles artificiais, substitutos ósseos e cartilaginosos (TAMPA e HANGAN, 2014).

O mercado nacional de produtos para saúde ocupa a nona posição mundial em relação ao subsistema de base mecânica, de eletrônica e de materiais para o complexo econômico industrial da saúde (MALDONADO, *et al.*, 2013), movimentando U\$19,7 bilhões em 2014 (crescimento de 249% entre 2007 e 2014) e cerca de 20% deste montante foi gasto com dispositivos médicos implantáveis (DMI) (ANS, 2016). Ademais, os dados da balança comercial brasileira de 2015 apresentam a realidade em que o país se encontra neste importante setor da economia, com retração nas importações entre os períodos de 2014 e 2015 (-14,5%) e queda nas exportações. Estes dados ainda refletem uma situação muito desconfortável face um país continental como o Brasil e pelo número de universidades e indústrias presentes neste segmento (**Tabela 6**) (ABIMO, 2013). Alterar este cenário de déficit exige uma longa jornada diante do horizonte desvantajoso de transição demográfica até 2030, até que o Estado possa garantir melhor acesso às tecnologias de saúde, como as próteses ortopédicas, bem como o atendimento universal de qualidade do SUS (FERMAM, 2015).

Tabela 6. Balança comercial brasileira - área da saúde (adaptado de ABIMO) Valores arredondados para milhões.

EXPORTAÇÃO BRASILEIRA POR SEGMENTO - NCMS ABIMO EM US\$ FOB					
Segmento	jan-out 2013	jan-out 2014	jan-out 2015	var. % 14\13	var.% 15/14
Consumo	297	307	273	3,2	11,1
Equip.Médico	62	56	64	10,9	14,1
Implantes	110	111	119	0,3	7,2
Laboratório	31	74	80	141,8	7,5
odontologia	96	97	57	1,1	10,8
Radiologia	21	23	25	7,8	9,5
Total geral	617	666.	645	7,9	-3,2
IMPORTAÇÃO BRASILEIRA POR SEGMENTO - NCMS ABIMO EM US\$ FOB					
Segmento	Jan-Out 2013	Jan-Out 2014	Jan-Out 2015	var. % 14\13	var.% 15/14
Consumo	1.049	1.031	985	-1,7	- 4,5
Equip.Médico	833	876	670	5,1	- 23,5
Implantes	608	626	506	3	- 19,2
Laboratório	915	867	724	-5,2	- 16,5
odontologia	111	99	91	-11	- 8,4
Radiologia	593	555	485	-6,5	- 12,6
Total geral	4.111	4.055	3.460	-1,4	- 14,7

Siglas: jan=janeiro, out = outubro, var = variação, Equip = equipamento. NCMS= Nomenclatura comum Mercosul. FOB= *Free on Board*.

Apesar dos importantes avanços no Brasil no campo econômico e nas políticas públicas de saúde, estima-se que em 2004 cerca de R\$ 575 milhões tenham sido gastos com cirurgias ortopédicas e deste montante, R\$ 145 milhões foram destinados ao pagamento de próteses ortopédicas (SOARES, 2005). Dados como estes apontam cada vez mais para relevância deste setor para a economia do país, já que estes valores são impactados pelos altos custos da matéria-prima, com titânio, bem como o seu processamento até o produto final (FARIA *et al.*, 2012).

No Brasil, o parque industrial do setor de base mecânica, eletrônica e de materiais está concentrado majoritariamente na região sudeste (55,2%) (**Figura 9**). No entanto, o mercado ainda passa por transformações no campo tributário, técnico e regulatório de forma a viabilizar, no futuro, uma relação mais harmônica com

diferentes setores da sociedade brasileira e consequentemente contribuir com a pesquisa e desenvolvimento de novos biomateriais e equipamentos médicos



Figura 9: Distribuição regional complexo industrial da saúde. (Modificado de: ABIMO, 2014).

De acordo com os dados apresentados até o momento, considera-se fundamental que a relação entre a universidade e o setor industrial evolua de tal forma que novos biomateriais possam surgir para benefício da população brasileira e de toda a América do Sul. Esta realidade gera um grande desafio para ciências químicas e biológicas, bem como para muitos setores governamentais.

Portanto, faz-se necessário usar o poder transformador da ciência para o desenvolvimento de novos biomateriais que possam contribuir com o arsenal terapêutico do tratamento das lesões ortopédicas associadas a perdas ósseas.

2 JUSTIFICATIVA

No campo de pesquisa dos substitutos ósseos cerâmicos sintéticos, em especial a HAP e o β -TCP, há vasto relato científico. Estes materiais cerâmicos biodegradáveis ou reabsorvíveis, são empregados quando se deseja que o enxerto seja totalmente reabsorvido e substituído por tecido ósseo normal. A inclusão de íons ferro na estrutura cristalina do composto, visa promover efeito indutor do fenótipo osteogênico, sem perder a característica de osteocondução. Dentre as dificuldades encontradas na elaboração de biomateriais que servirão como substituto ósseo estão: a manutenção da resistência mecânica, controle das taxas de solubilização e crescimento do tecido ósseo, e estabilidade na interface entre o biomaterial e o tecido hospedeiro.

Sendo assim, o desenvolvimento de um substituto ósseo com perfil físico-químico que atenda às exigências fisiológicas, como perfil de solubilização *in situ* e biocompatibilidade, poderia levar a futuras pesquisas clínicas, além de incentivar políticas públicas de acesso da população a tecnologias destinadas ao tratamento de perdas ósseas com baixo custo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

O objetivo central deste projeto é sintetizar um substituto de tecido ósseo, um ortofosfato de cálcio dopado com íons ferro (Fe^{3+}) a partir de uma fonte natural de íons cálcio, a casca do ovo da galinha.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Sintetizar fosfatos de cálcio dopados com íons Ferro (Fe^{3+}), nas concentrações de 5, 10, 15 e 20% mol do cátion como fase majoritária da síntese;

3.2.2 Avaliar o nível de complexidade da síntese pela análise de eventuais fases indesejadas;

3.2.3 Verificar a capacidade de adesão das células MG63 cultivadas em presença do fosfato de cálcio dopado com Fe^{3+} e na casca de ovo da galinha;

3.2.4 Avaliar a viabilidade celular para a casca de ovo da galinha e para os demais compostos dopados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizando a COG da espécie *Gallus Gallus domesticus* (galinha de granja) obtida do consumo doméstico, a metodologia deste trabalho foi segmentada em três fases. Na primeira, foram realizadas as etapas de preparo das COG e síntese química dos compostos alvo: β -TCP e β -TCP cátion substituído. Na segunda fase, iniciaram-se as operações de processamento e caracterização dos compostos produzidos na fase anterior e, na terceira fase, foram feitos testes biológicos para verificar alguns dos parâmetros de biocompatibilidade inerentes aos compostos cerâmicos, produzidos com diferentes concentrações do cátion Fe^{3+} como descrito no fluxograma resumindo (**Figura 10**).

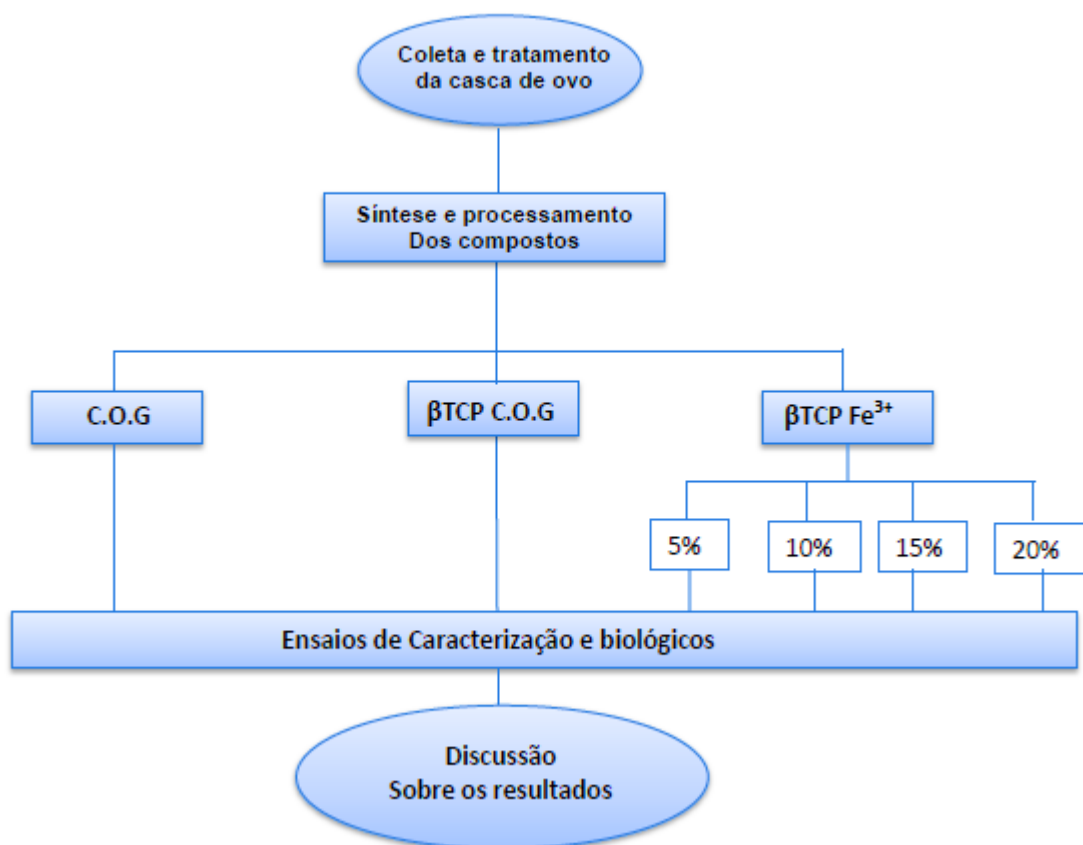


Figura 10. Desenho experimental do estudo. Da obtenção da matéria-prima de origem natural até a síntese dos compostos β TCP e β TCP cátion substituído. C.O.G. : casca do ovo da galinha ; TCP : tricalciofosfato

4.1 Reagentes químicos

Para a realização de todas as reações químicas, foram preparadas diferentes soluções a partir dos reagentes grau para análise (P.A): ácido nítrico (HNO_3 , Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), hidrogeno fosfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3]$, Merck Millipore], hidróxido de amônio (NH_4OH , Merck Millipore) para a correção do pH das reações, carbonato de cálcio (CaCO_3 , Merck Millipore) e Cloreto férrico (FeCl_3 , Merck Millipore). Além destes reagentes, as soluções utilizadas em todas as reações tiveram como diluente água destilada (FreseniusKabi Ind. Bras.), álcool 70°(Via Pharma Ind e Com.) e COG como fonte de íons cálcio.

4.2 Fase I: preparo das COGs e síntese química

4.2.1 Preparo das COGs

As COGs, após a coleta, foram lavadas em água corrente para retirada de contaminantes superficiais e, posteriormente, mantidas em solução desincrustante a 20% (desincrustante natural Higimed[®]- Biomecanica Ind. Com.) por 2 h, a 60°C, para facilitar a remoção de matéria orgânica residual. Após este período, as GOGs foram novamente lavadas em água corrente para retirada da solução desincrustante. Posteriormente, iniciou-se a retirada manual da membrana interna.

Ao final deste processo, as COGs foram trituradas e lavadas novamente com água corrente e álcool 70°. Por fim, o material de partida foi encaminhado à estufa para secagem a temperatura de 70°C por 3 horas e armazenado para uso posterior **(Figura 11)**.

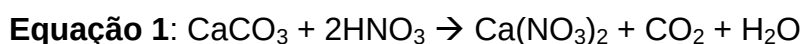


Figura 11. Casca de ovo da galinha triturada após limpeza (arquivo pessoal).

Desse modo, para a obtenção do fosfato e cálcio a partir da casca do ovo da galinha com diferentes substituintes catiônicos, seguiu-se a metodologia a seguir.

4.2.2 Obtenção do nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$.

O nitrato de cálcio, composto intermediário para a produção do substituto ósseo proposto neste trabalho, foi obtido por duas vias: a primeira utilizando o carbonato de cálcio a partir da casca do ovo da galinha (GOMES *et al.* 2012). A equação química abaixo descreve a rota utilizada.



Para a produção da solução estoque, partiu-se de 20 g de COG previamente preparada (item 4.2.1). Esta massa foi levada a um bécher e, após levemente ser umedecida com água destilada, iniciou-se o gotejamento lento de 500 mL de ácido nítrico 1M, a 40°C sob agitação moderada em capela de exaustão por 24h. Após

este período, foi observada uma solução amarelada com resíduos remanescentes de casca de ovo e membrana interna. A solução foi filtrada de tal forma a reter todo o resíduo sólido remanescente da reação, para que estes valores entrassem no cálculo da concentração teórica da solução. Após todos os devidos descontos das massas não reagidas, chegou-se ao volume final de 471,2mL de solução de nitrato de cálcio a partir da casca do ovo da galinha na concentração de 0,36 molar (**Figura 12**).

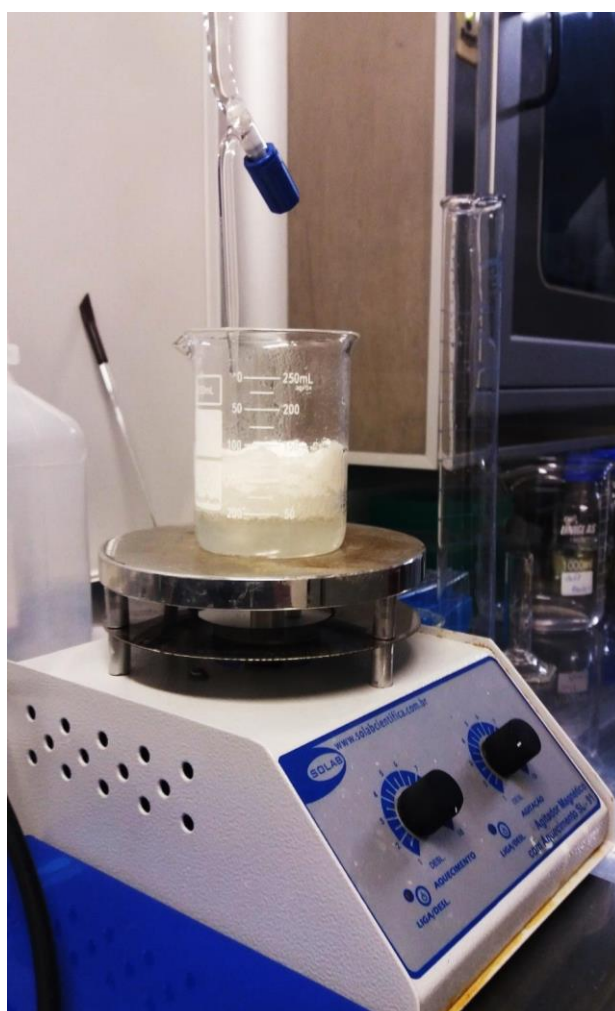
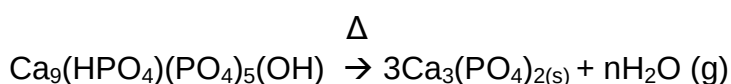
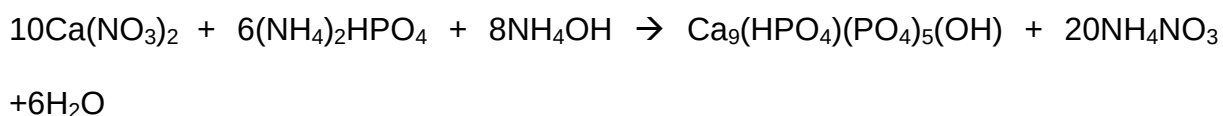


Figura 12. Processo de obtenção do nitrato de cálcio a partir da casca do ovo da galinha. Gotejamento lento de ácido nítrico (1 molar) sob aquecimento e agitação moderada (Arquivo pessoal).

4.2.3 Síntese do fosfato de cálcio a partir da COG.

Para esta operação, partiu-se das concentrações teóricas contidas na solução estoque de nitrato de cálcio obtidas na etapa anterior, conforme apresentado no item 4.2.2. Em um balão de fundo chato de 500mL com três bocas, foram adicionados 30mL da solução de nitrato de cálcio a partir da casca de ovo da galinha e sob forte agitação, o sistema foi aquecido a 40°. Ao atingir a temperatura planejada, iniciou-se o gotejamento lento (3 mL/min.) da fonte de fosfato $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ com a solução de hidróxido de amônio 3 M para o ajuste do pH em 7,0 (**Figura 13**). Após completar o gotejamento, o sistema manteve-se nas condições de agitação e temperatura por 60 min. A equação 2 apresenta a rota de síntese utilizada como referência para alcançar um dos composto objeto do estudo, o TCP (CARRODEGUAS e AZA, 2011).

Equação 2:



Ao final da reação foi observada a formação de um precipitado branco que posteriormente foi lavado até pH 7,0 e levado ao envelhecimento³ por 24 horas em temperatura ambiente. Ao término do período de envelhecimento, o precipitado foi filtrado e levado para um ciclo de secagem a 70°C/24h. Este processo de lavagem

³ Envelhecimento: terminologia utilizada em análise gravimétrica relacionada a transformações irreversíveis em precipitados sob condições controladas, como crescimento de cristalitos.

foi realizado com o intuito de promover a solubilização de eventuais compostos formados ao longo da síntese.



Figura 13. Síntese dos fosfatos de cálcio dopados com íons ferro. Reações contendo 5%, 10%, 15% e 20% em mol de cátions Fe^{3+} , a partir da COG. Reações realizadas em capela de exaustão, com temperatura, volume e agitação controlados (**arquivo pessoal**).

Após o período de secagem em estufa, o “pó verde”⁴ foi levado ao almofariz para desaglomeração na menor granulometria possível e acondicionado em dessecador para posterior processamento (conformação mecânica e sinterização), caracterização e ensaios biológicos.

4.2.4 Síntese do fosfato de cálcio cátion substituído

Conforme apresentado no fluxograma (**Figura 10**), foram produzidos quatro grupos de compostos, para a realização das dopagens. Cada grupo respeitou a

⁴ Pó verde: terminologia utilizada para identificar o material sólido antes de passar pelo tratamento térmico. Neste caso específico, sinterização em forno mufla a 1000°C.

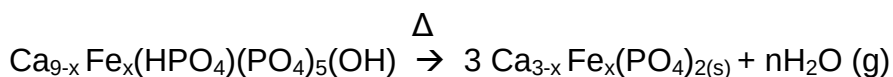
razão molar Ca^{2+}/P e metal substituinte em 1,5. Estas diferentes relações em percentual molar para cada metal foram calculadas de modo a manter a fase cristalina do β -TCP. Utilizando o mesmo vaso de reação da etapa de produção do composto não dopado, um segundo funil de separação foi adaptado para a inserção dos reagentes doadores dos cátions Fe^{3+} (FeCl_3 em diferentes percentuais em mol) substituintes para as respectivas substituições no sítio cálcio do composto correspondente (**Tabela 7**).

Tabela 7. Distribuição em massa para os grupos do ferro.

Cátions	5 %mol	10 %mol	15 %mol	20%mol
Fe^{3+}	0,15g	0,29g	0,44g	0,59g

Ao finalizar o gotejamento, a suspensão foi novamente levada ao envelhecimento por mais 24h com posterior lavagem, filtração, secagem por 24 horas. Após a secagem, os compostos foram armazenados e levados para o tratamento térmico. A equação 3 ilustra a etapa reacional (LAZORYAK *et al.*, 1996).

Equação 3:



4.2.5 Processamento do material

Esta etapa compreende a conformação mecânica dos corpos de prova e sinterização dos mesmos. Os corpos de prova foram produzidos na forma de

pastilhas utilizado uma prensa hidráulica (Bovenau P10ST, São Paulo, Brasil), carregando a matriz com 150 mg do pó sintetizado sob 2 toneladas de força. Todas as amostras (corpos de prova e pós) produzidas foram conduzidas ao tratamento térmico em forno mufla (Graphite Furnace Atomizer, Shimadzu – GFA.EX7, Kyoto - Japão) para a conversão do pó (verde) na fase cristalina do fosfato de cálcio produzido. A temperatura de sinterização foi padronizada em 1000°C com rampa de 5°C/minuto e patamar de 2 horas. Ao finalizar esta etapa, todas as amostras obtidas foram conduzidas para ensaios de caracterização das fases e análise química.

4.2.6 Conformação mecânica e tratamento térmico

Os pós secos em estufa foram levados a prensagem uniaxial (2 toneladas), obtendo discos de 8 mm de diâmetro. Após esta etapa os corpos de prova foram levados à sinterização para futura esterilização e ensaio de adesão celular (**Figura 14**).

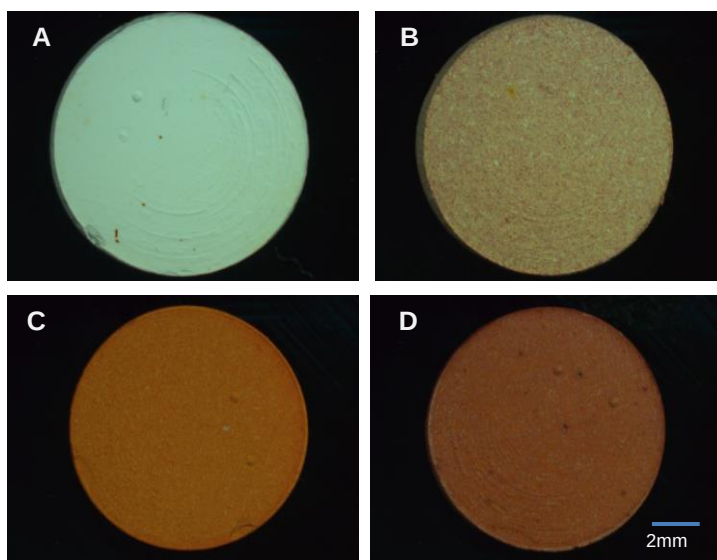


Figura 14. Corpos de prova de fosfatos de cálcio dopados obtidos a partir da COG. Sínteses com diferentes percentuais em mol de ferro após prensagem uniaxial. Fe^{3+} 5%mol (A), Fe^{3+} 10%mol (B), Fe^{3+} 15%mol (C), Fe^{3+} 20%mol (D). Barra de escala corresponde a 2mm.

4.3 Caracterização físico-química

Complementando a etapa experimental, foram realizadas diferentes análises para caracterização das fases do carbonato de cálcio a partir da casca do ovo e dos fosfatos de cálcio sintetizados.

4.3.1 Difração de raios X

Os sólidos sintetizados foram inicialmente submetidos à identificação das fases presentes com a utilização de um difratômetro de raios X (Philips modelo X'Pert, Eindhoven, Holanda) - monocromador de Cobre (raios X tipo $K\alpha$) e tubo operacional de 40 KV e 30 mA, no Laboratório de Difração de raios X do Instituto Militar de Engenharia. A identificação das fases foi realizada pelo software *X'Pert High Score plus* com base nas fichas cristalográficas padrão JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*).

O princípio geral da difração de raios X concentra-se na captação de feixes difratados de átomos em arranjos regulares no espaço da rede cristalina. O ângulo 2θ está relacionado diretamente com o espaço interplanar e por intermédio da equação fundamental de Bragg (lei de Bragg) é possível identificar parâmetros relevantes para a identificação de fases cristalinas de sólidos (SURYANARAYANA, 1998). A **Figura 15** apresenta um difratograma de raios X do composto β -TCP.

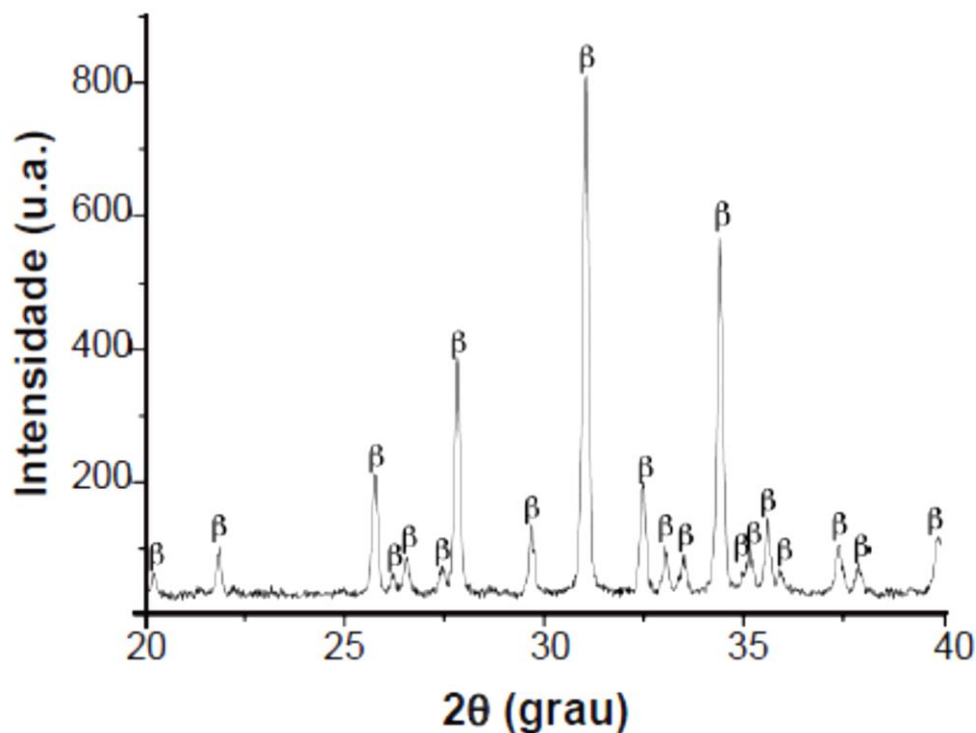


Figura 15. Difratoograma de raios X do β -TCP (Adaptado de TORRES *et al.*, 2015).

4.3.2 Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), (Shimadzu, IR Prestige-21, Japão) permite identificar os grupos químicos funcionais presentes nos compostos. Trata-se de uma técnica de grande utilização em diversas áreas da ciência como nas áreas de síntese orgânica, inorgânica e biológica, onde de maneira complementar a outros tipos de análises como, a difração de raios-X, permite confirmar o composto sintetizado. As moléculas, quando submetidas a um campo eletromagnético, absorvem energia respondendo por um mecanismo de excitação vibracional justificado pela variação periódica dos dipolos elétricos dos compostos durante as vibrações. Portanto, o resultado disso é um

espectrograma apresentando bandas de absorção de energia específica de cada grupo funcional (TORRES *et al.*, 2015) (**Figura 16**).

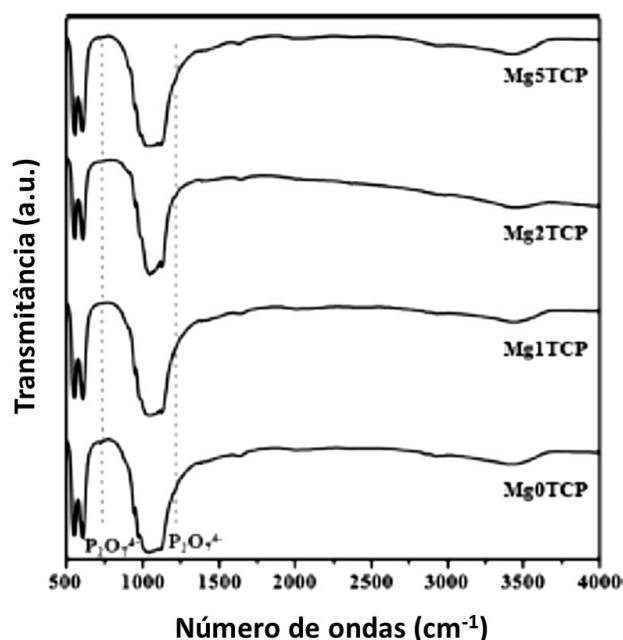


Figura 16. Espectro de infravermelho por transformada de Fourier de β -TCP magnesiânica (Adaptado de TORRES *et al.* 2015).

4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS).

A análise por MEV avaliou a morfologia superficial dos pós e das pastilhas submetidas ao tratamento térmico, enquanto que por EDS (Oxford Inc. Abingdon Oxfordshire,UK) permitiu a análise qualitativa de sua composição elementar. As análises foram realizadas no laboratório de microscopia da universidade Federal do Rio de Janeiro. Para a realização deste experimento, as amostras foram devidamente depositadas sobre uma fita dupla face de carbono em um suporte de alumínio onde, posteriormente foram observadas no MEV (modelo Quanta 250, Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA), operado em 30 kV com detecção de

elétrons secundários. Os espectros de raios X foram adquiridos por 3 minutos e as energias dos raios-X específicos de cada átomo (picos Ka e Kb) mostradas em espectros.

4.4 Ensaios biológicos

Em função das diferentes substituições e suas respectivas concentrações, considerou-se fundamental a realização de alguns dos ensaios padronizados pela norma internacional que trata dos ensaios biológicos para dispositivos médicos (ISO 10993-5, 2003).

4.4.1 Ensaios de citotoxicidade *in vitro* – direto e indireto

Para o ensaio indireto de citotoxicidade, 200 mg dos compostos sintetizados foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL e levados para esterilização em autoclave (121°C/1,5h). Em seguida, foi adicionado 1mL de meio DMEM (não suplementado) em cada tubo durante o período de 72h em estufa a 37°C com 5% de CO₂, umidade de 95% (Panasonic, modelo MCO-19AIC-PA, Gunma, Japão) para a extração de possíveis componentes solúveis que pudessem apresentar efeitos tóxicos às células. Com base nestas informações, é possível inferir, quais compostos evoluíram para testes biológicos complementares.

Células de linhagem de osteossarcoma humano - MG63 em terceira passagem foram utilizadas para o ensaio indireto, sendo expandidas concomitantemente ao período de extração de componentes solúveis das amostras.

Foram semeadas 3×10^3 células por poço em placa de 96 poços de fundo chato em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Quando em

confluência de 80%, as células foram incubadas com os meios de extração em estufa a 37°C/5% CO₂ por 24 horas nas seguintes condições:

Grupo 3. Controle negativo (células tratadas com meio DMEM)

Grupo 4. Ferro 5% mol

Grupo 5. Ferro 10%mol

Grupo 6. Ferro 15% mol

Grupo 7. Ferro 20% mol

Grupo 8. CaCO₃ (COG)

Grupo 9. TCP

Após o período de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT. Inicialmente 10 µL de uma solução de MTT⁵ a 5mg/mL foram adicionados aos 100 microlitros de meio de cultivo em cada poço e incubada por 2 horas a 37°C. Posteriormente, o meio foi descartado e foram adicionados 50 µL de dimetil sulfóxido (DMSO – P.A) por poço, seguindo para agitação por 5 minutos, com posterior análise em comprimento de onda de 570 nanômetros (Glomax-multiR Promega Biotecnologia, Campo Belo, São Paulo - Brasil). Por fim os dados da leitura foram tratados em software GraphPad Prisma 5.0.

Para o ensaio direto de citotoxicidade os pós sintetizados e conformados em pastilhas (seção 4.2.6) foram esterilizados em autoclave (121°C/2h). Posteriormente, as células de linhagem MG63 foram cultivadas sobre as mesmas (1x10⁴ células) por período de 24 h em placa de 24 poços. Somente no caso da COG optou-se em utilizá-la diretamente (triturada), tendo esta passada por processos prévios de limpeza e esterilização, uma vez que a COG na forma de pó, não apresenta boa agregação durante a compressão. Vale destacar que a matéria-prima natural não

⁵ Ensaio MTT: O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um teste amplamente utilizado para determinação da viabilidade celular.

poderia passar pelo tratamento térmico em função da sua degradação a óxido de cálcio (CaO), não desejado para os experimentos planejados. Comparativamente, planejou-se promover uma superfície desprovida da camada de glicoproteínas da casca de ovo, com o intuito de comparar a adesão celular nos dois tipos de tratamento. Desta forma, o material após ter passado pelo processo de limpeza, conforme metodologia deste trabalho (4.2.1), foi imerso em uma solução de hipoclorito de sódio por 12 horas seguido de lavagem abundante em água corrente. Após a realização deste procedimento, o material seguiu para cultura celular nas mesmas condições anteriores, para observar o perfil de resposta celular às superfícies tratadas interna e externamente.

Após o período de incubação, os fragmentos de COG's foram submetidos a análises por MEV. As células cultivadas nas superfícies do material, foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% e posteriormente os corpos de prova foram submetidos à desidratação seriada com etanol em diferentes concentrações, sendo em seguida cobertos com uma fina camada de ouro pelo método de "gold-sputtering" (Bal-tec, modelo: SCD 005, Alemanha) para melhorar o sinal de elétrons secundários e evitar carregamento elétrico da pastilha.

4.5 Análise estatística

A comparação entre os grupos no ensaio indireto de citotoxicidade foi avaliada pelo método de comparação múltipla de Dunn's (GraphPad Prism versão 5.1), considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Difração de Raios X

Para a identificação das fases cristalinas, foi realizada a caracterização do material utilizando o software *Highscore Plus*, aplicando a análise quantitativa pelo método de Rietveld. Os resultados dos difratogramas foram analisados com base nas fichas cristalográficas PDF (*Powder Diffraction File*) indexadas no programa conforme ICDD (*International Centre for Diffraction Data*). Podemos observar as fases do carbonato de cálcio a partir da COG, TCP não dopado e dos pós sintetizados a 5%, 10%, 15% e 20 % em mol de Fe^{3+} (**Figuras 17-22**).

Foram identificados ao longo das análises para a casca do ovo, picos correspondentes às fases Calcita (CaCO_3 – PDF 00-005-0586), Dolomita [$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ – PDF 00-014-0409] e Huntita [$\text{Mg}_3\text{Ca}(\text{CO}_3)_4$ – PDF 00-036-0426] em percentuais correspondentes a 64,4%, 17,8% e 17,8% respectivamente, de acordo com a quantificação realizada por refinamento de Rietveld (**Figura 17**).

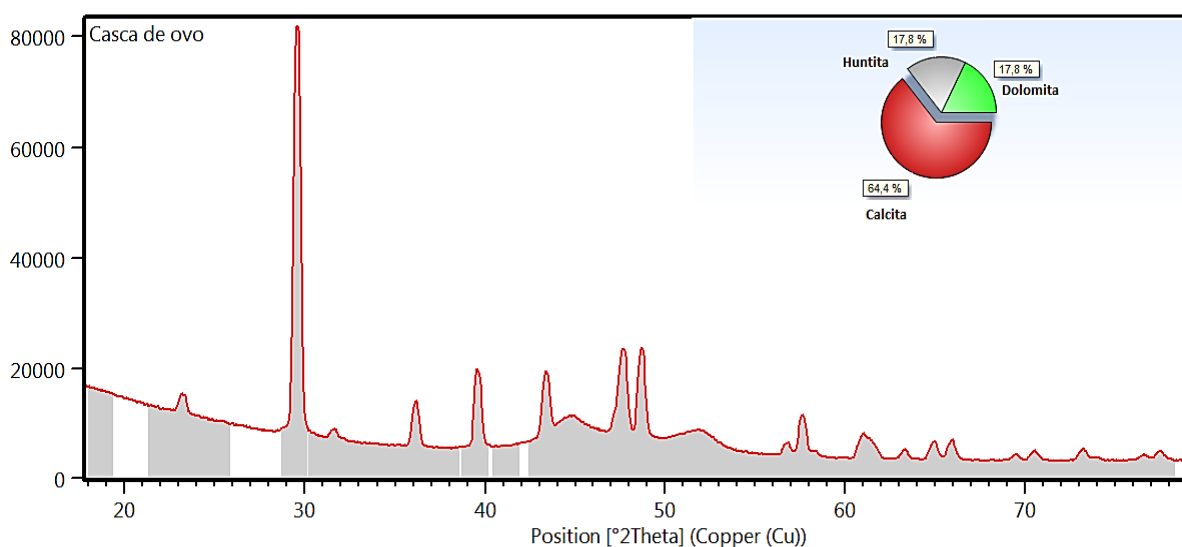


Figura 17. Difratograma de raios X de carbonatos de cálcio a partir da casca do ovo da galinha.

A difração de raio X revelou que os picos correspondem a fase cristalográfica ortorrômbica do composto TCP, como fase majoritária (91,3%) segundo a ficha PDF 00-009-0169 e como fase secundária obteve-se o pirofosfato de cálcio (8,7%) PDF 00-009-0346, de acordo com análise quantitativa (**Figura 18**).

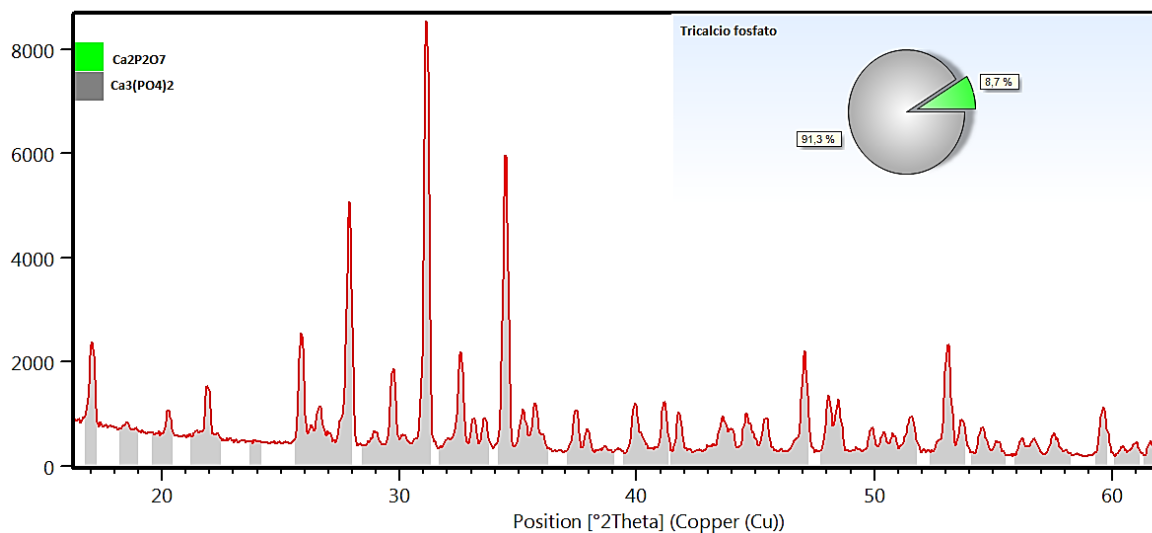


Figura 18. Difratoograma de raios X do beta tricalcio fosfato obtido a partir da casca de ovo da galinha. Amostra tratada a 1000 °C com patamar de 2 horas.

Quanto ao processo de dopagem, obteve-se uma redução em massa após a sinterização na ordem de 14%. O difratograma correspondente a amostra com 5% em mol de Fe^{3+} apresentou duas fases distintas. Como fase majoritária obtivemos o composto tricálcio fosfato, indicando que não ocorreu efetivamente a substituição do cálcio por íons ferro na estrutura cristalina do composto e a fase hematita (Fe_2O_3) (**Figura 19**).

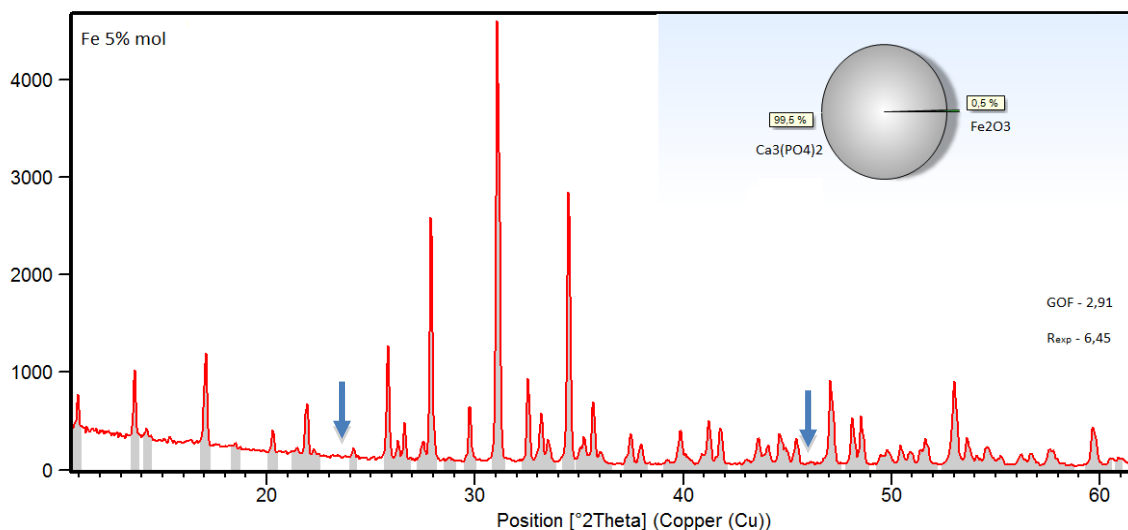


Figura 19. Difratoograma de raios X da amostra dopada com 5% mol de ferro. Composição majoritária correspondente ao tricálcio fosfato e setas indicando a presença de segunda fase (Fe_2O_3).

Ao analisar a amostra correspondente a dopagem em 10% em mol de ferro, verificou-se perda de 20% da massa após a sinterização. Observa-se, entretanto, a formação do fosfato duplo de cálcio e ferro [$\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$] e dois picos ($23,223^{\circ}$ e $49,496^{\circ}$) correspondentes à fase hematita (Fe_2O_3), conforme apresentado no difratograma (**Figura 20**).

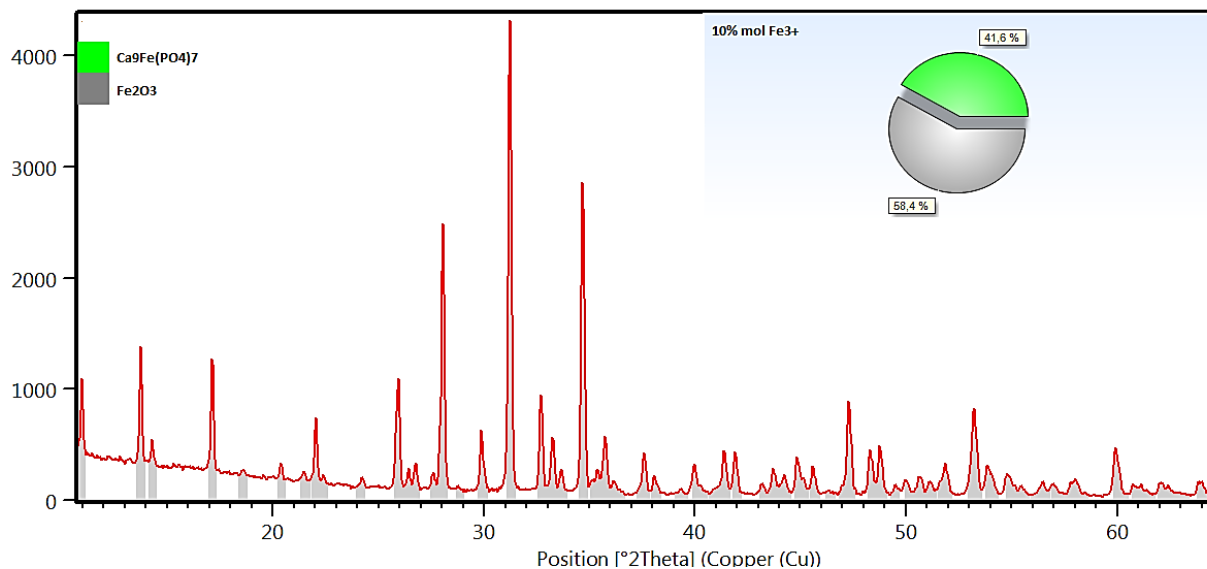


Figura 20. Difratoograma de raios X da amostra dopada com 10% mol de ferro. A fase minoritária corresponde à fase do fosfato de cálcio dopado (1) e fase majoritária ao óxido de ferro (hematita).

Podemos visualizar os resultados das fases obtidas durante a reação do composto dopado com 15% em mol de ferro, verificando 22% de perda em massa após o tratamento térmico. As fases observadas são o fosfato duplo de cálcio e ferro (fase minoritária) e novamente a hematita como fase majoritária (**Figura 21**).

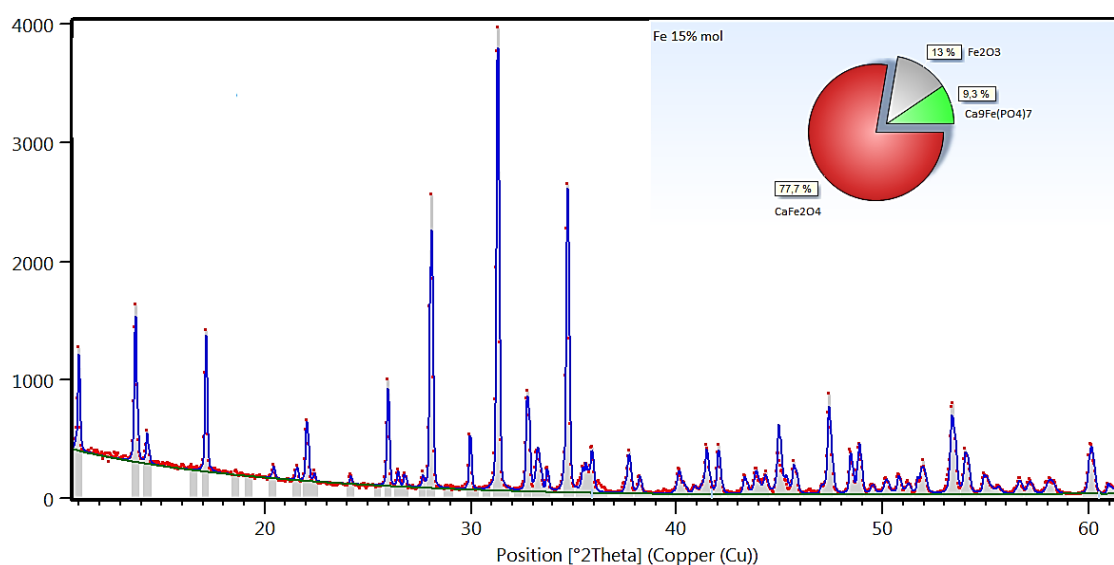


Figura 21. Difratoograma de raios X da amostra dopada com 15% mol de Ferro.

O primeiro ciclo de ensaios de caracterização se encerra com a análise de difração de raios X da amostra contendo 20% em mol de íons ferro. Destaca-se a presença de três fases distintas, fosfato de ferro (FePO_4), o fosfato de cálcio e ferro [$\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$] e como fase majoritária hematita (Fe_2O_3), com perda de massa após a sinterização, em 24% (**Figura 22**).

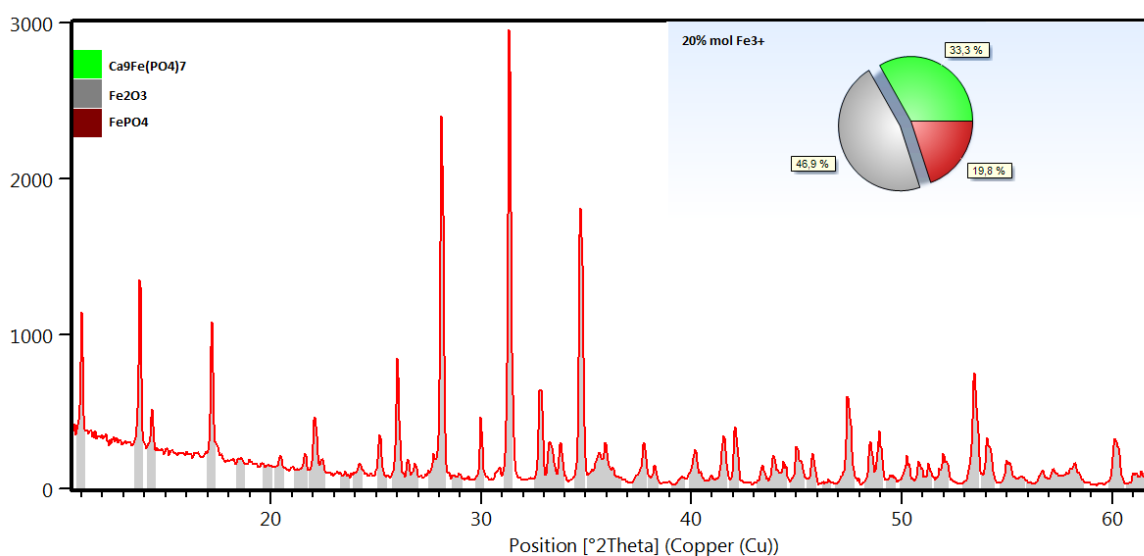


Figura 22. Difratoograma de Raios X da amostra dopada com 20% mol de ferro. Presença de três fases distintas sugere limite para a manutenção de duas fases entre o fosfato duplo de cálcio e ferro e o óxido correspondente.

5.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A próxima etapa de caracterização visou a identificação dos grupos funcionais das amostras sintetizadas, o TCP e os fosfatos dopados com íons ferro nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% em mol. Para o TCP não dopado, observa-se modo vibracional de estiramento (ν_4) de grupos fosfato entre 550 cm^{-1} e 611 cm^{-1} , além do modo de estiramento simétrico (ν_1) de fosfatos entre 1047 cm^{-1} e 1119 cm^{-1} . No entanto, não foi verificada banda de O-H na região 1 do espectro,

confirmando a ausência de fase hidroxiapatita, mas notamos a banda de baixa intensidade em 3446 cm^{-1} correspondendo a água de adsorção (**Figura 23**).

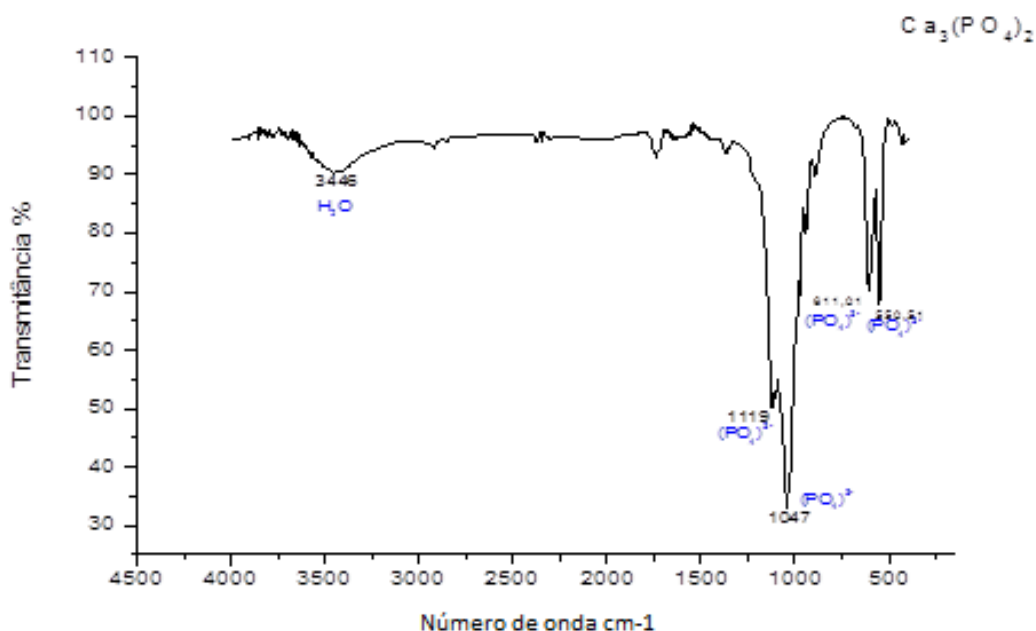


Figura 23. Análise por Infravermelho do fosfato de cálcio não dopado.

Na reação de dopagem com ferro 5% mol de ferro, observou-se o padrão morfológico de bandas semelhante aos outros grupos dopados com ferro, mas sem o efeito da dopagem, apresentando modo vibracional de estiramento simétrico (ν_4) dos grupos fosfato entre 551 cm^{-1} e 1137 cm^{-1} e banda de carbonato em 1454 cm^{-1} . Adicionalmente, em 1752 cm^{-1} verifica-se banda de HPO_4^{2-} e em 2922 cm^{-1} com modo vibracional de estiramento de ligação O-H (**Figura 24**).

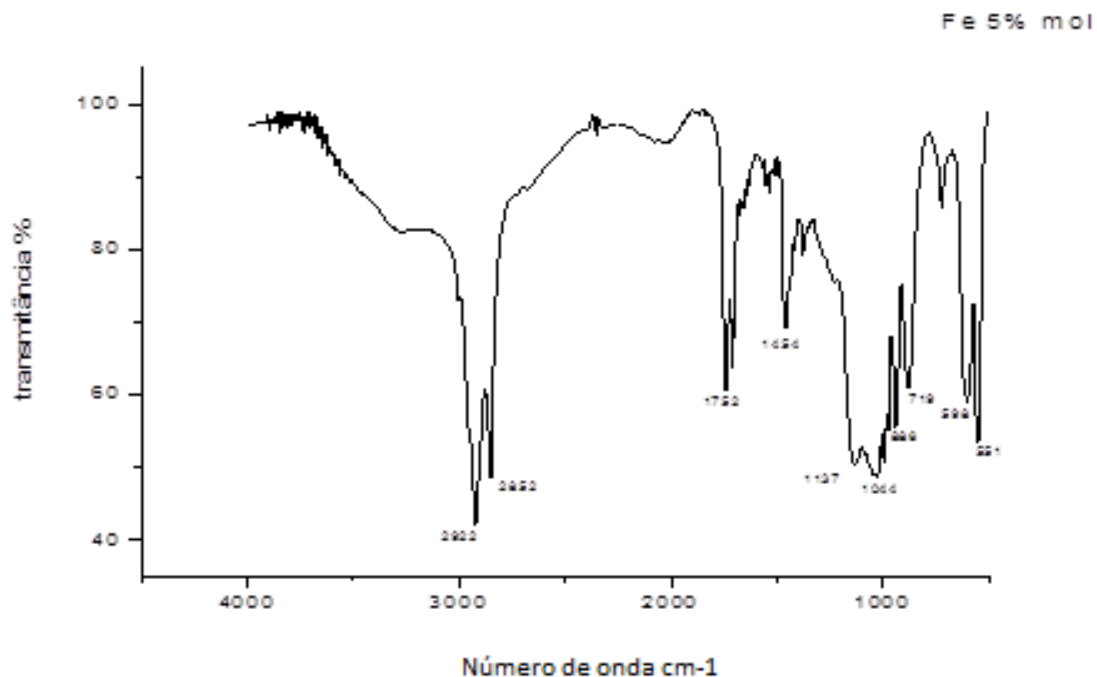


Figura 24. Análise por infravermelho da amostra dopada com 5% mol de ferro.

Na síntese do fosfato de cálcio dopado com 10% em mol de ferro observou-se o mesmo padrão de espectro de infravermelho, no entanto algumas bandas surgem em número de ondas diferentes, como resposta a entrada de mais cátions substituintes. Desta forma, verificou-se modo vibracional de estiramento simétrico (ν_4) dos grupos fosfato em 551cm^{-1} e 598cm^{-1} , banda de carbonato em 868cm^{-1} e modo de estiramento de fosfatos (ν_3) em 1147cm^{-1} , além de banda de carbonato em 1464cm^{-1} . Já em 1738cm^{-1} observou-se banda de HPO_4^{2-} e em 2922cm^{-1} repetindo-se o modo vibracional de estiramento de ligação O-H (**Figura 25**).

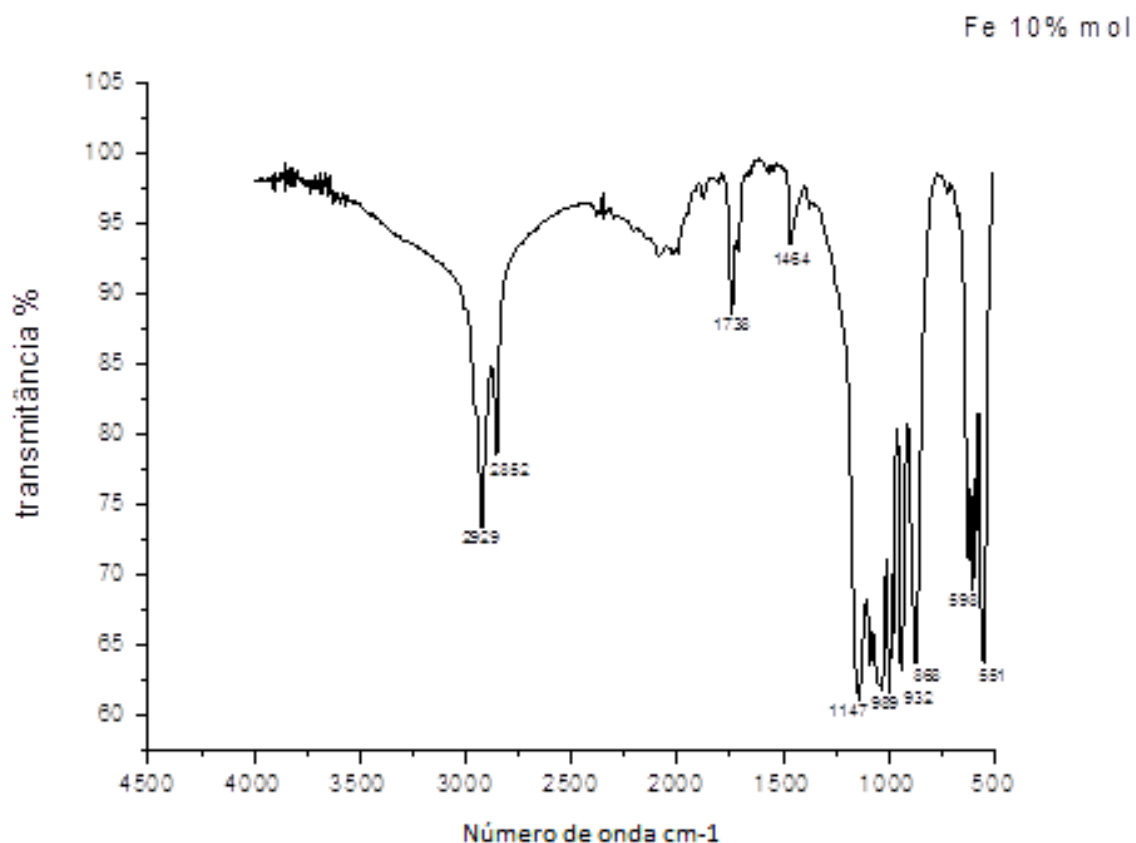


Figura 25. Análise por Infravermelho da amostra dopada com 10% mol de ferro

Na síntese do fosfato de cálcio dopado com 15% em mol de ferro, verificou-se modo vibracional de estiramento simétrico (ν_4) dos grupos fosfato em 551cm^{-1} e 602cm^{-1} , banda de carbonato em 887cm^{-1} e modo de estiramento de fosfatos (ν_3) entre 942 e 1156cm^{-1} . Identificou-se banda de carbonato em 1464cm^{-1} e em 1742cm^{-1} observando banda de HPO_4^{2-} . Em 2922cm^{-1} ocorre o modo vibracional de estiramento de ligação O-H (**Figura 26**).

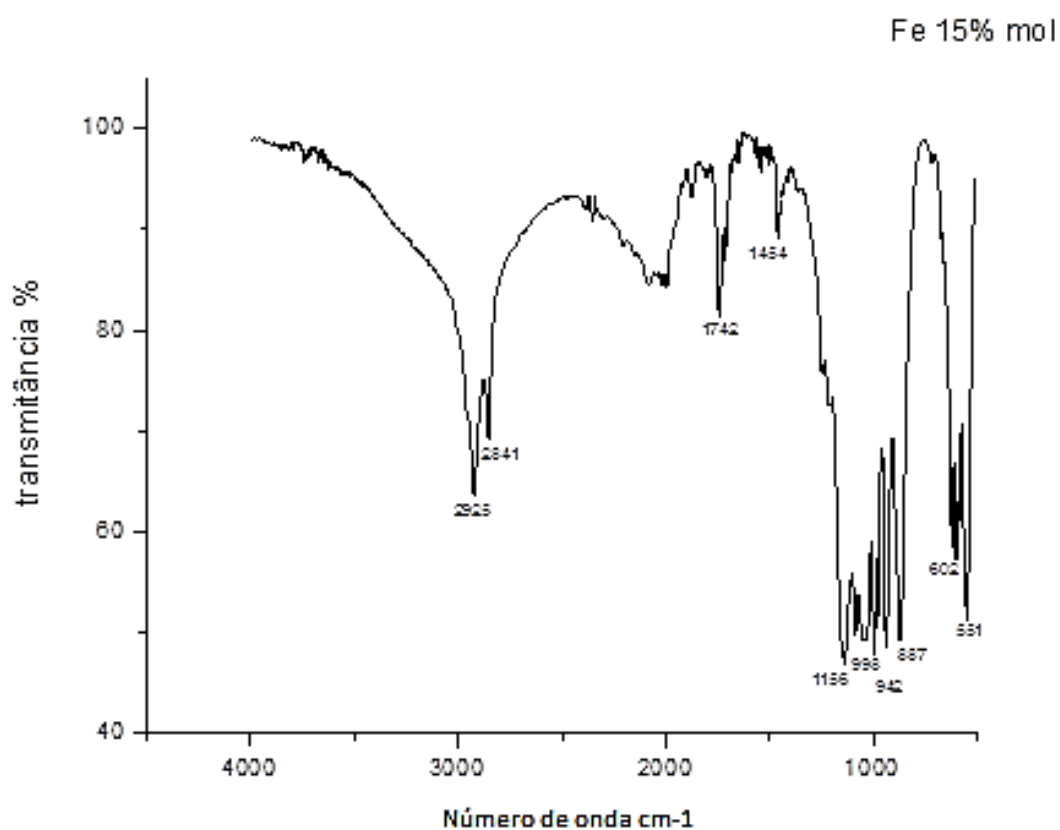


Figura 26. Análise por infravermelho da amostra dopada com 15% mol de ferro.

Finalizando a etapa de caracterização via infravermelho, a amostra correspondente a 20% em mol de ferro destaca um padrão semelhante de bandas de fosfato entre 551cm^{-1} e 1156 cm^{-1} . Além disso, observa-se uma redução na intensidade das bandas que corresponde a ligação O-H (2925 cm^{-1}) e banda na faixa entre 1900cm^{-1} e 2200cm^{-1} (**Figura 27**).

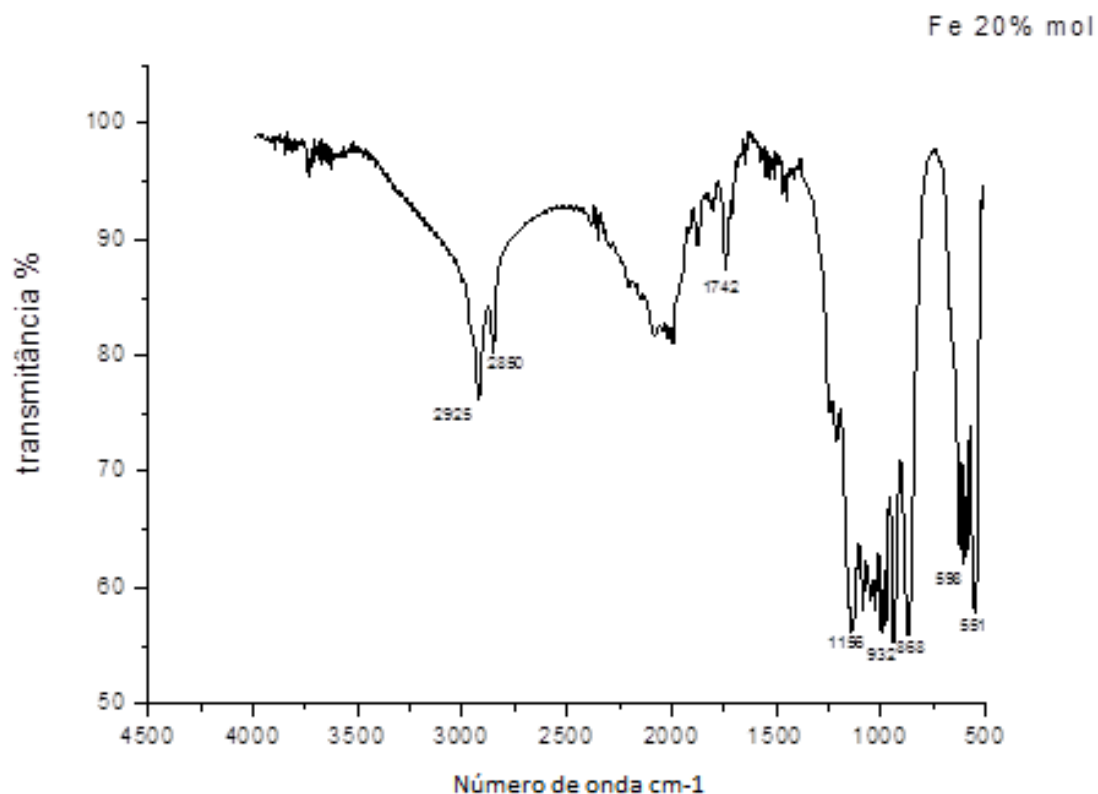


Figura 27. Análise por Infravermelho da amostra dopada com 20% mol de ferro

5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) / espectroscopia de raios X por Energia Dispersiva (EDS).

Após a caracterização dos compostos sintetizados, foi realizada a avaliação topográfica do corpos de prova por MEV, bem como a análise semi-quantitativa dos elementos químicos que compõem as amostras pela microanálise via EDS.

As imagens em MEV revelam superfície irregular dos corpos de prova, em menor e maior aumento, dopados nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% em mols de íons ferro (**Figura 28, A-D'**).

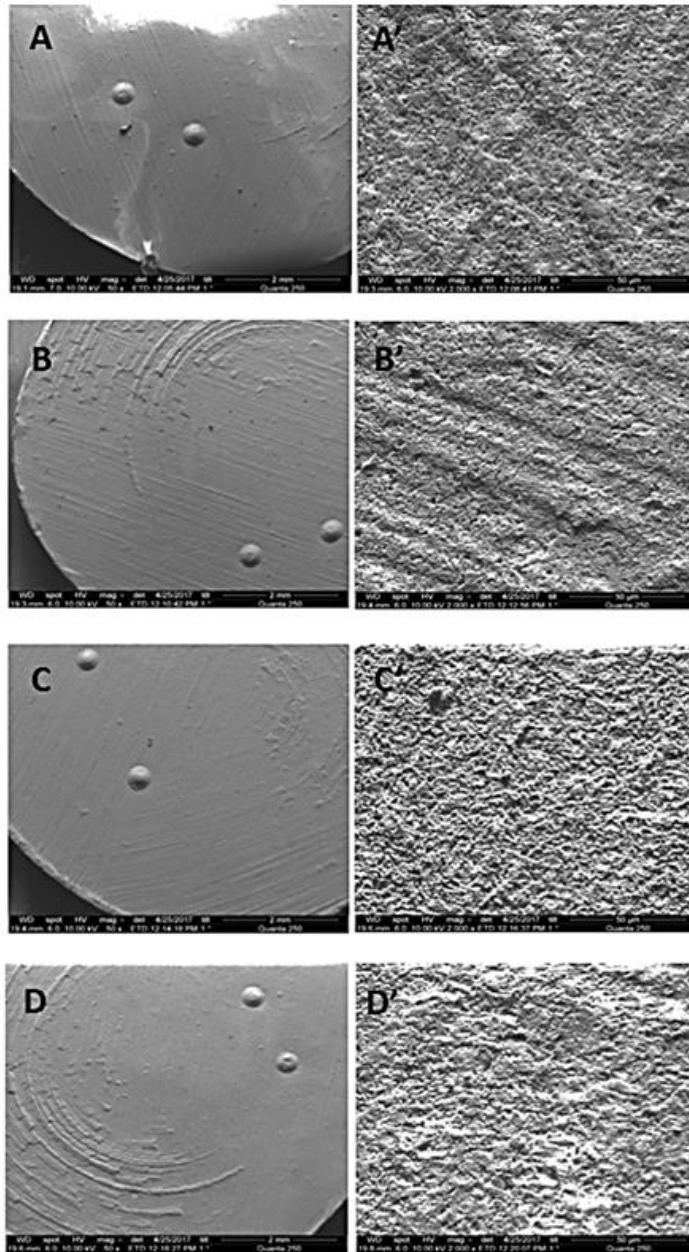


Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura das pastilhas de fosfato de cálcio dopadas com ferro: eletromicrografia do fosfato de cálcio com 5% mol de ferro (A-A'), 10% mol de ferro (B-B'), 15% mol de ferro (C-C'), e 20% mol de ferro (D-D'), em maior e menor aumento.

As relações semi-quantitativas obtidas pela EDS dos corpos de prova dopados, revelam progressivo aumento da intensidade dos picos para os íons ferro na região estudada da amostra (**Figura 29, A''-D''**).

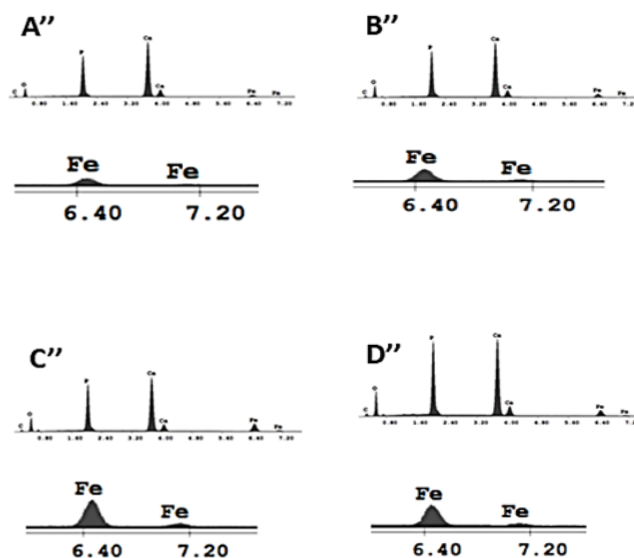


Figura 29. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS). Gráfico correspondente a presença de ferro nas amostras dopadas com 5%, 10%, 15% e 20% (A'', B'', C'', D'') respectivamente.

A Tabela 8 apresenta a distribuição percentual em massa dos elementos correspondentes às dopagens, destacando a variação de ferro em 20% mol.

Tabela 8. Análise semi-quantitativa das dopagens por EDS				
Íons	Fe 5%	Fe 10%	Fe 15%	Fe 20%
Ca	25,60%	22,8%	20,1%	18,7%
Fe	1,68%	3,01%	5,73%	2,87%
P	20,30%	20,05%	19,22%	19,15%
O	39,00%	41,20%	42,83%	46,56%

5.4 Ensaios Biológicos

5.4.1 Ensaio indireto de citotoxicidade

Após o período de cultivo das células com os meios de extração conforme apresentado no item 4.4.1, verificou-se pela quantificação do ensaio de redução do MTT que não houve diferença significativa entre os grupos por análise de variância ($P=0,423$) (**Figura 30**).

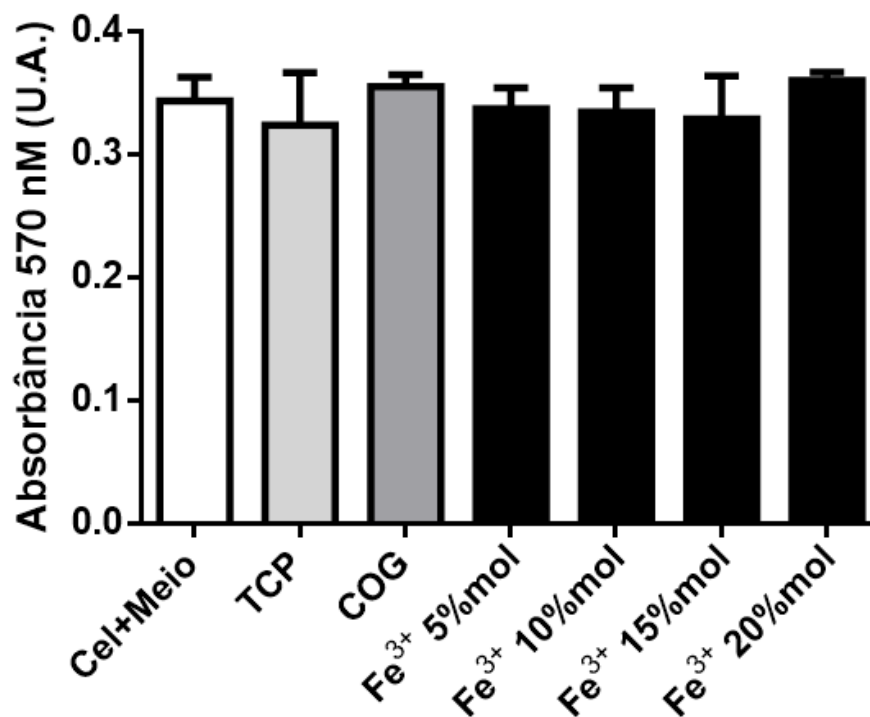


Figura 30: Ensaio de viabilidade celular por MTT. Viabilidade das células MG63 expostas por 24h a diferentes meios de extração contendo fosfato de cálcio dopado com ferro (5%, 10%, 15% e 20% em mol., células tratadas como meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cel+Meio), tricalcio fosfato (TCP) não dopado e casca do ovo de galinha (COG), ANOVA, $n=3$.

Silmultaneamente à realização dos ensaios de viabilidade foi avaliada a morfologia celular das condições experimentais. Todas as imagens foram obtidas na

região central do poço não foram notadas alterações morfológicas significativas nas células tratadas. (**Figura 31**).

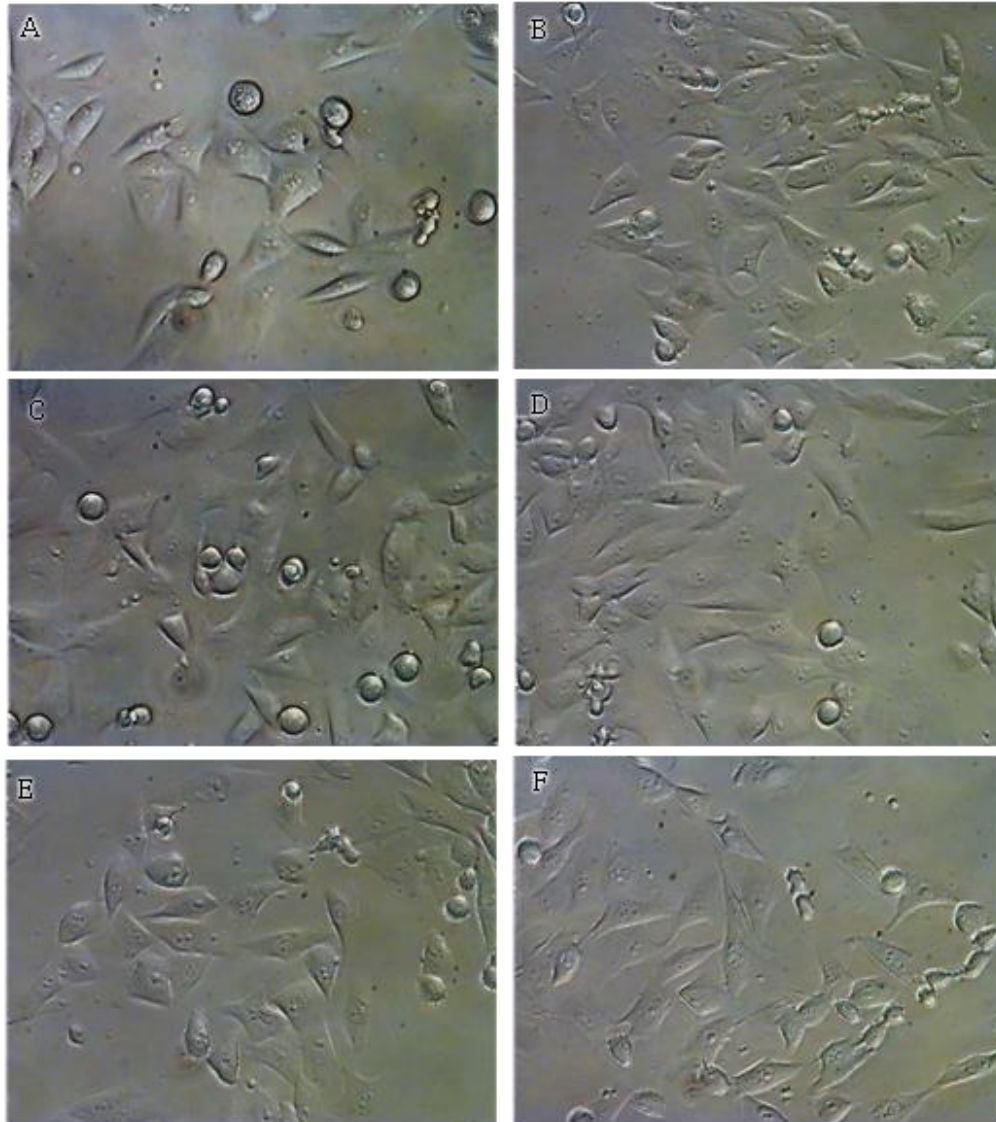


Figura 31. Fotomicrografia da cultura de células MG63 tratadas com os meios DMEM expostos aos fosfatos de cálcio dopados. Células MG63 cultivadas sobre o tricalcio fosfato (A), casca do ovo de galinha (B), fosfato de cálcio dopado com ferro 5% mol (C), 10% mol (D), 15% mol (E) e 20% mol (F).

5.4.2 Ensaio direto e avaliação morfológica da células MG63

O ensaio direto de citotoxicidade foi realizado cultivando as células nas superfícies das amostras (COG e pastilhas dopadas com ferro a 5%, 10%, 15% e 20% mol), confrontando com os resultados do ensaio indireto

Foi observado, entretanto, que as células MG63 não aderiram a nenhuma das duas superfícies, interna e externa da COG. Este dado, sugere que pelo menos as camadas mais superficiais da casca do ovo conferem característica inerte ao material, não favorecendo o reconhecimento biológico pelos receptores de membrana relacionados a adesão (**Figura 32**).

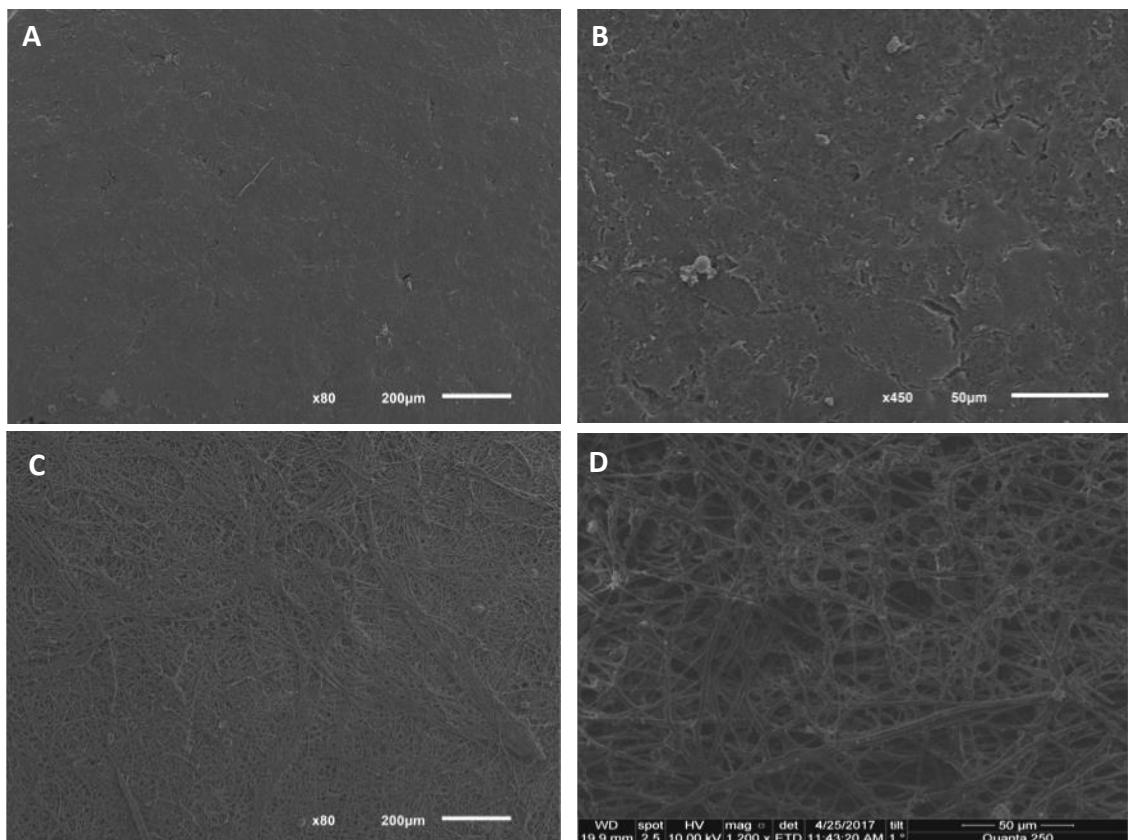


Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura de cultura celular sobre as superfícies da casca do ovo. Avaliação da superfície externa (A-B) e superfície interna (C-D) após cultura de células por 24 horas.

No entanto, após o processo de limpeza e tratamento por 12 horas com hipoclorito de sódio, foi observado perfil diferente de resposta celular às superfícies interna e externa. A população de células MG63 aderiu às superfícies da COG, sugerindo comportamento bioativo do material (**Figura 33 A-F**).

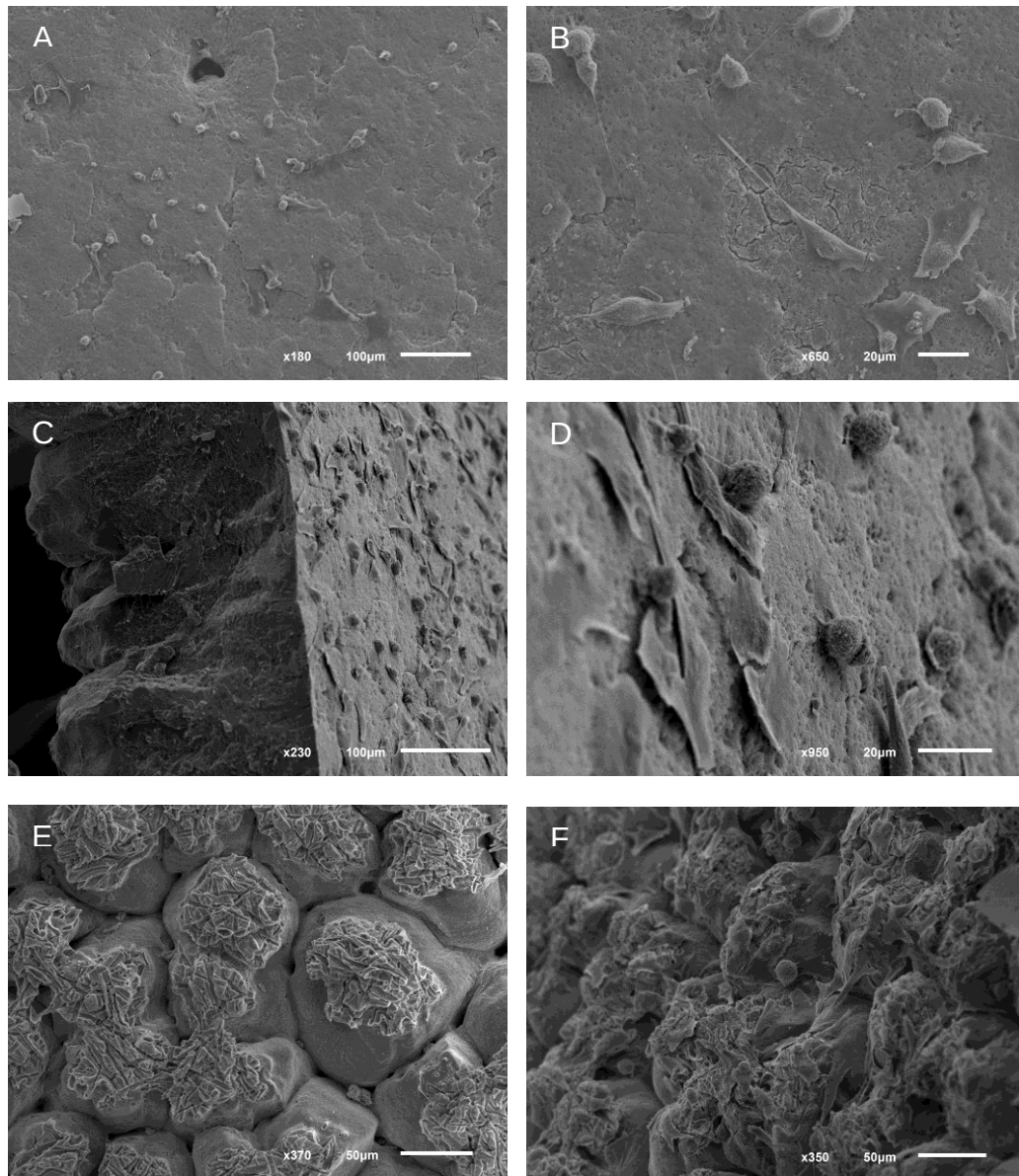


Figura 33. Microscopia eletrônica de varredura da casca do ovo nas superfícies externa e interna após tratamento com hipoclorito de sódio. Cultura das células MG63 após período de incubação de 24 horas. Superfície externa (A-D) e superfície interna (E-F).

As avaliações morfológicas das células cultivadas sobre os fosfatos de cálcio dopados com ferro 5% mol e 10%, mol revelou excelente perfil de adesão celular sobre todas as amostras, sendo possível evidenciar espreadimento das células e seus prolongamentos citoplasmáticos sobre o material (**Figura 34, A-D**). Em relação ao efeito na superfície do composto, após a cultura, verifica-se solubilização da amostra gerando formação de poros superficiais (**Figura 34, E-F**).

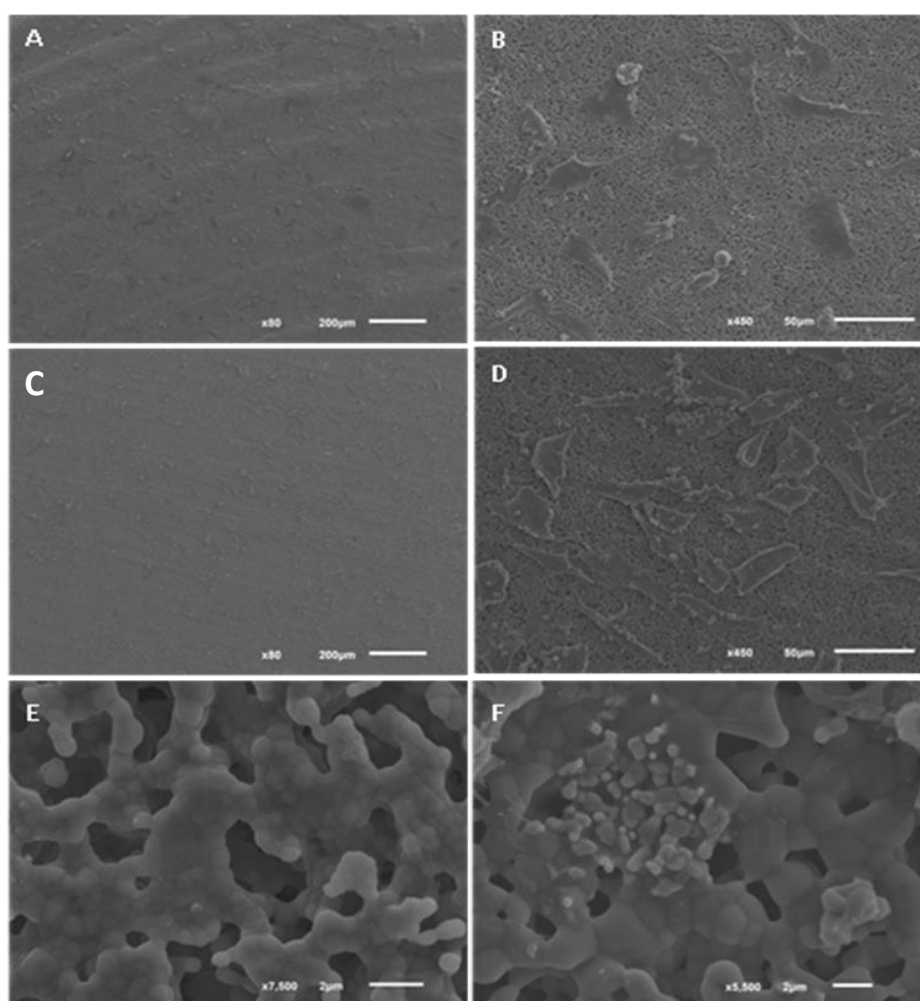


Figura 34. Cultura celular sobre um corpo de prova de fosfato de cálcio dopado com ferro 5% e 10% mol. (A), Fotomicrografia do corpo de prova de fosfato de cálcio dopado com ferro 5% mol, em menor aumento (B), ferro 5% mol, em maior aumento (C), ferro 10% mol, menor aumento (D), ferro 10% mol, em maior aumento

Foram também realizadas as avaliações por MEV das células MG63 cultivadas sobre fosfato de cálcio dopado com ferro 15% mol e 20 % mol. Verificou-se uma excelente adesão das células MG63 sobre os dois materiais além da manutenção do perfil de solubilização da superfície após 24 horas de cultura (**Figura 35, A-F**).

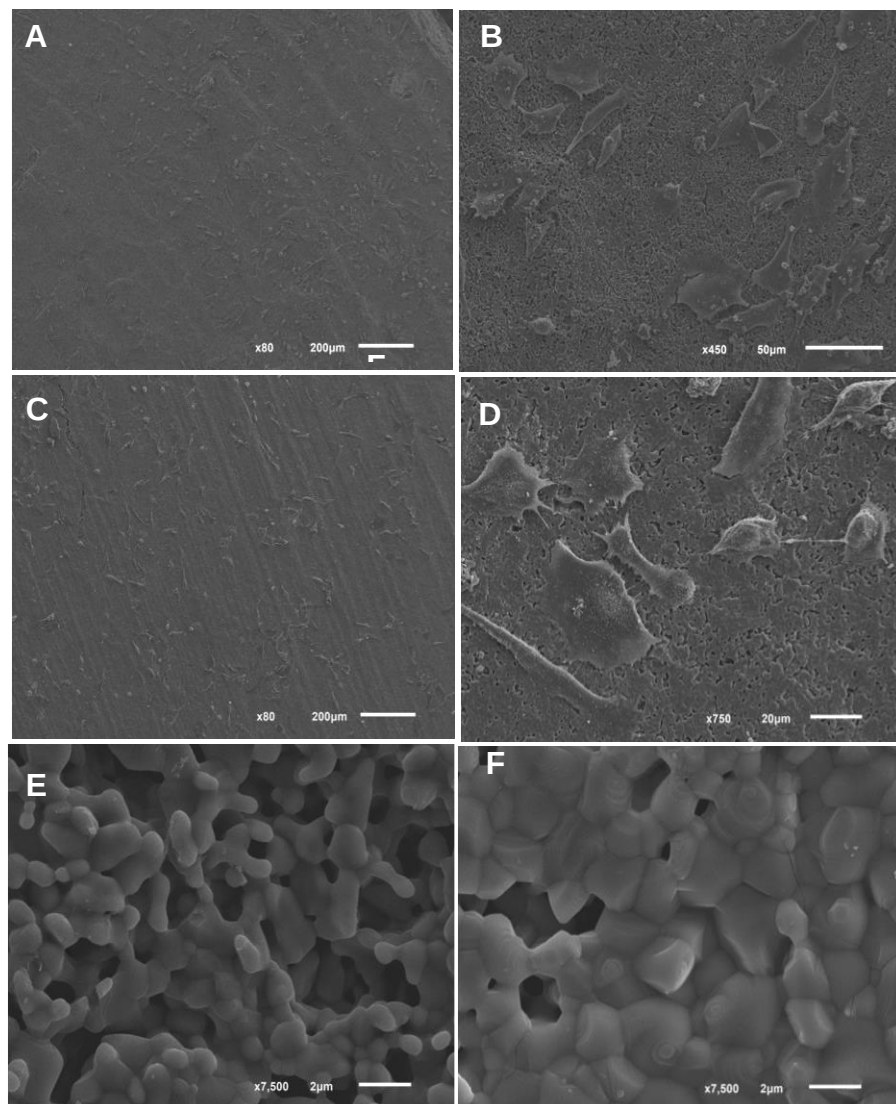


Figura 35. Cultura celular sobre um corpo de prova de fosfato de cálcio dopado com ferro 15% e 20% mol. (A), Fotomicrografia do corpo de prova de fosfato de cálcio dopado com ferro 15% mol, em menor aumento (B), ferro 15% mol, em maior aumento (C), ferro 20% mol, menor aumento (D). ferro 20% mol, em maior aumento

6. DISCUSSÃO

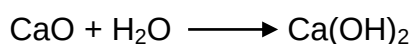
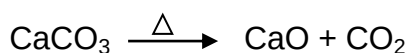
6.1 O preparo da casca do ovo

O elevado volume descartado de cascas de ovos anualmente torna este resíduo uma rica fonte de carbonato de cálcio, um grande atrativo para diversas aplicações principalmente nos campos da agricultura, indústria e farmacêutica (LIPPENS *et al*, 2017). Conforme apresentado na equação 1 da metodologia, a obtenção da solução de nitrato de cálcio a partir da casca do ovo da galinha, inicialmente teve sua motivação na disponibilidade da matéria-prima, bem como nos resultados alcançados nos cálculos da energia livre de Gibbs que apresentaram valores entre -30KJ/mol e -40KJ/mol em comparação com as rotas via ácido sulfúrico e ácido acético (GOMES, *et al* 2012).

A rota utilizada neste trabalho, via formação do nitrato de cálcio, permitiu um bom controle das etapas de síntese e validação do processo com baixo custo de produção. A validação da solução de nitrato de cálcio produzida a partir da fonte natural foi realizada pela análise de quantificação por absorção atômica de chama, sendo fundamental para a padronização do produto de partida, favorecendo a realização dos cálculos estequiométricos para as etapas posteriores. Embora a obtenção da fonte natural de íons cálcio seja simples, alcançar bons rendimentos nesta operação exige ajustes das condições laboratoriais, tais como concentração do reagente de ataque, temperatura e tempo da reação e definição da granulometria da matéria-prima para que melhores rendimentos. Vale destacar que ao longo dos experimentos, foi observado variação em 10% para menos na concentração do nitrato correspondente em comparação aos valores dos cálculos teóricos. De

maneira alternativa, o nitrato de cálcio pode ser obtido pela calcinação do carbonato de cálcio, reagindo posteriormente com ácido nítrico (HOONNIVATHANA *et al* 2012),. Alguns autores utilizam a casca do ovo como fonte natural de íons cálcio para a produção de substitutos ósseos sintéticos, sendo a rota de conversão inicial do carbonato de cálcio em hidróxido de cálcio muito utilizada, como apresentada na equação 4 (JIRIMALI *et al.*, 2017).

Equação 4



6.2 Difração de raios X

Analisando o difratograma referente a casca de ovo da galinha, verificou-se a presença de três fases cristalinas para a casca do ovo, a calcita, dolomita e a huntita. Embora a literatura aponte que nas análises de difração de raios X a calcita apresente-se como fase única, mesmo com a presença de carbonato de magnésio na matéria-prima, considera-se a composição química da casca do ovo da galinha contendo de 94% a 97% de carbonato de cálcio (MURAKAMI *et al.*, 2007; KING`ORI, 2011). (VALE, *et al.*, 2014). Para a realização da análise quantitativa básica por difração de raios X, utilizamos fichas CIF para as fases, respectivamente: calcita (1812275), dolomita (1813618) e huntita (1813119) apresentando valor do *gof* em 3,11.

6.3 Dopagem com íons Ferro

Os processos de dopagem realizados introduzindo diferentes percentuais em mol de íons ferro (5%, 10%, 15% e 20%), resultaram na formação de um fosfato duplo de cálcio e ferro $[\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7]$ e um óxido de ferro (Fe_2O_3) em todos os casos de dopagem. Vale destacar, no entanto, duas situações em particular: Em primeiro lugar, para a dopagem com 5% em mol de íons ferro, houve estabilização da fase tricalcio fosfato como fase majoritária e uma segunda fase hematita minoritária. Para os demais casos houve formação do fosfato duplo, mantendo o óxido de ferro como segunda fase. Para as produções dos fosfatos com 10 e 15 % em mol, houve manutenção das fases correspondentes às de 5% em mol, no entanto, a fase hematita assumiu a condição majoritária. No processo de inclusão de íons ferro em 20% mol, uma terceira fase foi obtida, o fosfato de ferro. Estes dados sugerem que há um ponto de saturação entre 5 e 10% em mol no processo de entrada do cátion, devendo ser analisado em experimentos futuros. Estes resultados corroboram com o trabalho de SINGH, *et al.* (2017), onde identificou-se limite de 5% mol de ferro para a manutenção da fase β -TCP. Desta forma, dentro destes limites, a composição química para substitutos trivalentes do sítio catiônico como o ferro seria $\text{Ca}_{3-3y/2}\text{Fe}_y(\text{PO}_4)_2$ (RENAUDIN *et al.*, 2017).

Os íons ferro não se apresentam aleatoriamente na estrutura dos fosfatos de cálcio, técnicas avançadas em refinamento estrutural auxiliam no mapeamento do composto, identificando os sítios específicos de entrada dos íons ferro. Ao longo das análises verificam-se valores referentes aos fatores de ocupação para cálcio e ferro identificando valores negativos para a entrada de cálcio em sítios específicos de hematita. Além disso, para a entrada de ferro no sítio hexacoordenado de cálcio (5)

para o fosfato tricálcico, os valores de refinamento estrutural foram positivos (DIEKENS, *et al.*, 1974). A **Figura 36** ilustra uma porção da célula unitária do fosfato duplo de cálcio e ferro correspondente.

Kumar *et al.*, (2016) propuseram a reação de entrada do ferro na estrutura do fosfato tricálcico, via nitrato de ferro, obtendo o ortofosfato não reduzido (**equação 5**).

Equação. 5

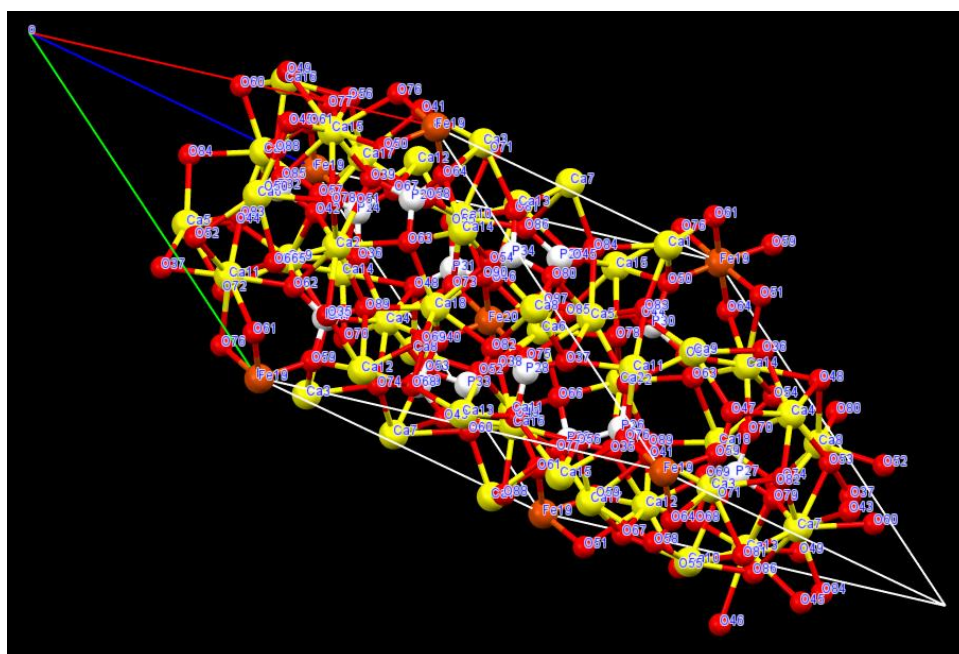
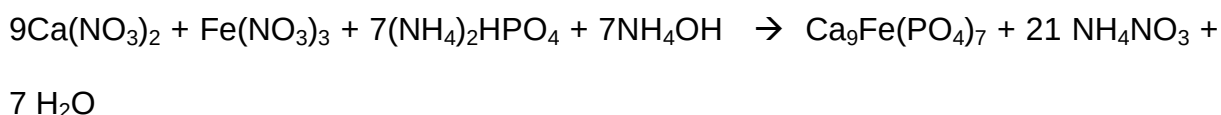
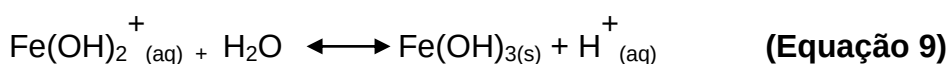
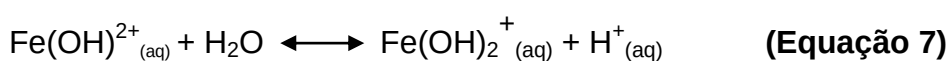
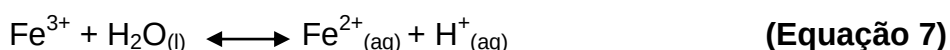


Figura 36: Estrutura tridimensional do fosfato de cálcio substituído com íons Ferro. Distribuição dos átomos ao longo da célula unitária romboédrica (arquivo pessoal. Software Mercury versão 3.6).

No que se refere a formação do óxido de ferro, diferentes etapas acontecem simultaneamente até a formação do íon férrico correspondente. Inicialmente ocorre a

solubilização da solução reagente (FeCl_3) em meio aquoso com o processo de hidrólise favorecendo a formação de um estado transitório reduzido (íon ferroso), seguida de um segundo estágio de oxidação até o hidróxido correspondente **(equações 6 a 9)** (VOGEL, 1981).



A partir da obtenção do precipitado (hidróxido de ferro III), a fase da hematita é convertida ao longo do tratamento térmico podendo sob condições específicas levar o metal ao seu estado fundamental (MADEIRA *et al*, 2014). De acordo com Benali, *et al* (2001), a formação do óxido de ferro (hematita) passa pelo estágio intermediário de um oxo-hidróxido ($\alpha\text{-FeO.OH}$) até sua total conversão em Fe_2O_3 **(equação 10)**. Desta forma, parece haver de fato um limite para a entrada de ferro em sítios de cálcio específicos e consequentemente levando o excedente à formação da fase hematita.

(Equação 10)



Desta forma, Lassoued *et al.*,(2017), obtiveram a hematita pelo método de precipitação via úmida com o cloreto férrico. Neste contexto, há uma direta relação

dos parâmetros de síntese, como temperatura, concentrações dos reagentes em solução, entre outros, com as características cristalográficas do composto.

As alterações de cores do produto em pó foram observadas a medida em que aumentavam-se as concentrações de cloreto férrico nas reações de dopagem, iniciando com uma tonalidade vermelho-alaranjado em 5% em mol, até um tom mais escuro em 20% mol. O ferro (metal de transição) e seus compostos, apresentam elétrons d^6 que os caracteriza por números de oxidação 2^+ e 3^+ . No processo de transição $d-d$, os elétrons, ao absorverem luz branca, são conduzidos a transições do tipo t_{2g} para e_g , e desta forma as amostras assumem alterações de cores. O processo de transição dos elétrons d dos elementos de transição quando expostos a luz branca, leva a absorção no campo do visível, podendo ser verificada a diferença de coloração conforme apresentado na figura 16 (ROUSSEL, 1994).

6.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Ao longo do processo de síntese de fosfatos de cálcio, observou-se presença de fases secundárias, face à sensibilidade que estas reações apresentam. Todos os parâmetros de produção devem ser cuidadosamente planejados e executados de forma a não se obter fases indesejadas na produção. Vale destacar que para todas as reações de dopagens, os resultados de difração de raios X apresentaram a hematita como fase majoritária para 10% e 20%mol, de tal forma que os espectros de FTIR identificaram bandas de absorção relativas à fases dos óxidos metálicos produzidos.

Para a amostra referente ao fosfato tricálcico não dopado, a análise por FTIR sugere a presença do composto sintetizado, pois ao transcorrer o processo de sinterização a 1000°C/2h observamos banda de baixa intensidade em 745 cm⁻¹ característica modo de estiramento correspondendo a banda de pirofosfato (P₂O₇⁴⁻). Ademais estes dados confirmam a informação apresentada pela difração de raios X, dada a ausência de estiramento de grupo (OH)⁻ em 3.600cm⁻¹, bem como a não identificação de banda larga de H₂O entre 2.800cm⁻¹ e 3.200cm⁻¹ (DESTAIVILLE, *et al.*, 2003).

Todos os grupos relativos às dopagens apresentam espectro semelhante, variando em suas intensidades e posicionamento das bandas. No entanto, segundo LAZORYAK, *et al.* (1996) bandas largas entre 2.500cm⁻¹ e 3.500cm⁻¹ caracterizam sobreposição de banda de água de adsorção na amostra e pico em 2900cm⁻¹ configurando presença de próton relativo ao grupo hidroxila. Esses dados referentes a esta faixa de análise, podem estar relacionados ao efeito da instrumentação, ou seja, como a preparação para a análise requer a utilização de brometo de potássio, e este por possuir marcante caráter higroscópico, favorece a adsorção de água. Embora usualmente considere-se banda de ligação metal-óxido em regiões de baixo número de onda (faixa entre 480 cm⁻¹ e 590 cm⁻¹), a utilização da espectroscopia Raman contribuiria para a identificação de bandas da ligação Fe-O. Outra possibilidade frente à redução do alargamento e intensidade das bandas compreendendo a faixa entre 2840 cm⁻¹ e 2950cm⁻¹ pode estar relacionada à diminuição de água de adsorção com o aumento do teor de óxido de ferro na amostra.

Corroborando esta teoria, bandas de absorção em 482cm⁻¹ são características da ligação Fe-O correspondentes à fase hematita, entretanto todos

os espectros das dopagens iniciaram a partir de 500cm^{-1} , não sendo possível observar a intensidade da banda de ligação Fe-O. Segundo BERARI *et al.* (2017), a região dos fosfatos (faixa que compreende $480\text{-}560\text{ cm}^{-1}$; $600\text{-}900\text{cm}^{-1}$ e $1000\text{-}1150\text{cm}^{-1}$) pode apresentar eventuais deslocamentos pela entrada de íons ferro, no entanto, uma banda de absorção do grupo Fe-O muito próxima à região dos fosfatos, pode ter contribuído para a resposta do alargamento das bandas de absorção apresentadas nos espectros $750\text{cm}^{-1} - 1150\text{cm}^{-1}$, característicos da região de fosfatos. De acordo com Kumar, *et al.* (2017), as análises de FTIR apontam que todos os compostos dopados com íons ferro apresentam-se no estado reduzido, $\text{Ca}_9\text{FeH}_{0,9}(\text{PO}_4)_7$, embora os resultados de difração de raios X deste trabalho apresentem dados correspondentes ao estado oxidado. Desta forma, análises complementares são necessárias para elucidar esta questão.

Vale destacar que para as reações de substituição catiônica, os resultados de difração de raios X identificaram a hematita como fase majoritária da produção para 10% e 20%mol, de tal forma que os espectros de FTIR apresentaram bandas de absorção relativas às fases dos óxidos metálicos produzidos.

Outro fator importante com relação à síntese está no fato de o pH exercer um importante papel na formação de fases, como os óxidos de ferro, impactando no comportamento das bandas de infravermelho. Como observado ao longo dos processos de dopagens, identifica-se banda em 2930 cm^{-1} , sugerindo correspondência à banda de O-H relativa à intercalação de prótons da rede de fosfato do composto reduzido $[\text{Ca}_9\text{FeH}(\text{PO}_4)_7]$ (BENARAF, *et al.*, 2000).

6.5 Análise morfológica por MEV

As imagens da superfície do material bem como a identificação qualitativa dos elementos que compõem a amostra foram realizadas por MEV e EDS. Ao longo do planejamento da produção dos corpos de prova, buscou-se avaliar a superfície do material observando uma rugosidade aparente. A topografia, composição química e a relação lipofilicidade/hidrofiliicidade da superfície são quesitos que vão ditar a relação célula-biomaterial, pois irão influenciar nos processos de adesão e proliferação celular (FEINBERG *et al.*, 2008). Ademais, o aspecto qualitativo da microanálise por EDS apresentou diminuição dos percentuais de cálcio a medida em que aumentava-se o teor de ferro na solução reagente.

6.6 Ensaio indireto de citotoxicidade

O ferro e seus estados de oxidação Fe^{2+} e Fe^{3+} participam em diversos eventos no corpo humano, como na fisiologia renal, circulatória e mineral, na forma de elementos traço. Desta maneira, pesquisa no campo de materiais cerâmicos apontam que substituições iônicas em regiões específicas na estrutura de compostos como hidroxiapatita e fosfato tricálcico beta, podem promover alterações em suas propriedades físico-químicas e na resposta celular, direcionando-se por exemplo para estudos de imagem em ressonância magnética, sistemas de liberação de drogas, separação de células e tratamento de tumores ósseos por hipertermia (GUPTA e GUPTA, 2005).

Considerando os dados da literatura que apontam a influência de substituições iônicas na estrutura cristalina de substitutos ósseos cerâmicos sobre a resposta celular verificamos a influência do meio de extração do ativo sobre as células MG63. A etapa experimental foi desenvolvida segundo critérios já

estabelecidos em normas internacionais (cláusula 10.3.5 da norma ISO 10993) e a análise estatística revelou não haver diferença significativa de toxicidade entre os grupos dopados com diferentes teores de íons ferro ($p = 0,423$).

Considerando o mecanismo de ação do ferro na diferenciação celular, ainda há na literatura uma indefinição quanto a via bioquímica, embora uma grande preocupação concentre-se na efetividade da estimulação celular e no seu efeito tóxico. De acordo com Yamazaki e Hagiwara, (2009) o excesso de íons ferro promove inibição da proliferação e diferenciação osteoblástica em células da linhagem MC3T3-E1, quando utilizada a concentração de $0,1\mu\text{g/mL}$ de citrato de amônio férrico. Por outro lado, Já foi demonstrado o efeito positivo de $200\mu\text{g/mL}$ de hidroxiapatita dopada com íons ferro sobre a viabilidade de células mesenquimais após 7 dias de ensaio (PANSERI *et al.*, 2016). A inclusão de ferro na estrutura de fosfatos de cálcio inibiu a transformação de fase β para α em fosfato tricalcico a 1250°C , e também promoveu resposta favorável para diferenciação em osteoblastos e proliferação celular na concentração de 0,5% em massa. VAHABZADEH e BOSE, (2016)

A cultura de células estromais de medula óssea de ratos em extratos e corpos de prova de fosfatos de cálcio com propriedades superparamagnéticas, não alterou a viabilidade celular e induziu o aumento da expressão de fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteoprotegerina e RUNX-2, que estão associados a diferenciação , bem como favoreceu a expressão de VEGF e óxido nítrico, associados à angiogênese. No entanto, o aumento nas concentrações de Fe^{3+} poderiam elevar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) levando a estágios de citotoxicidade (ZHANG , *et al.*, 2015).

A literatura aponta para fato de que respostas observadas em cultura de osteoblastos na presença de partículas de magnetita (Fe_3O_4) isoladamente ou recobertas com hidroxiapatita, chamam a atenção não somente para a baixa citotoxicidade induzida, mas para uma significativa expressão de fosfatase alcalina e colágeno sugerindo diferenciação celular (TRAN e WEBSTER , 2011).

6.7 Ensaio direto de citotoxicidade

Os experimentos *in vitro*, indicaram que a característica da superfície do substrato interfere na adesão das células no ensaio de cultivo celular sobre a casca do ovo não foi verificada adesão celular satisfatória. É possível que isso ocorra em função da superfície externa que atua como barreira física contra agentes que eventualmente poderiam ser nocivos ao embrião (DENNIS, *et al.*, 1996). Uma vez removida a camada orgânica através de tratamento químico de superfície, as células passaram a aderir na superfície da COG. Logo abaixo desta camada de material orgânico há uma segunda barreira, constituída de cristais de hidroxiapatita (ARIAS, *et al.*, 1993; DENNIS, *et al.*, 1996). Desta forma, o resíduo assume comportamento não inerte

Imagens de MEV mostraram que células MG63 foram capazes de aderir sobre os corpos de prova, indicando biocompatibilidade e permitindo o processo de adesão para todos os grupos.

7. CONCLUSÕES

A proposta de síntese de fosfatos de cálcio dopados com diferentes concentrações de íons ferro a partir da casca do ovo da galinha, permitiu a formação de formação de ortofosfato duplo de cálcio e ferro $[\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7]$. A concentração de 5% em mol de íons ferro não levou a formação do composto dopado, estabilizando a fase TCP e formação minoritária hematita, enquanto que nas concentrações de 10%mol e 15% mol houve formação do ortofosfato duplo de cálcio e ferro e hematita. No entanto, a reação com 20%mol de ferro indicou ponto máximo para a entrada de íons ferro pela formação de uma terceira fase, o fosfato de ferro. De maneira complementar aos resultados das sínteses, todos os grupos sintetizados demonstraram boa capacidade de adesão celular na superfície dos corpos de prova, bem como baixa citotoxicidade das células quando submetidas aos ensaios de viabilidade celular.

Portanto, a presença das fases hematita e fosfato duplo de cálcio e ferro por não apresentarem efeitos negativos às células, sugerem comportamento biocompatível com o meio biológico, podendo, assim, após ensaios complementares de biocompatibilidade, tornarem-se futuros candidatos a substitutos ósseos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEN, E. M.; BURGER, E. H.; NIJWEIDE, P. J. Function of osteocytes in bone. **Journal of Cellular Biochemistry**. V.55, n.3, p. 287-299, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ARTIGOS E EQUIPAMENTOS MÉDICOS, ODONTOLÓGICOS, HOSPITALARES E DE LABORATÓRIO. Balança Comercial Brasileira. Disponível em: <https://abimo.org.br/noticias/balanca-comercial-do-brasil/>. Acesso em 30/09/2017

AGENCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR. **Relatório Final do Grupo de Trabalho Externo de Orteses e Próteses e Materiais Especiais (GTE OPME) ANS/ANVISA**. Disponível em: http://www.ans.gov.br/images/stories/Participacao_da_sociedade/2016_gt_opme/gt-opme-relatoriointegral.pdf. Acesso em: 21 maio. 2017.

AOKI, H. Science and medical applications of hydroxyapatite. **Ishiyaku Euroamerica**, Japan, 1991.

ARIAS, J. L.; FINK, D. J.; XIAO, S.-Q.; HEUER, A. H.; CAPLAN, A. I. Biomineralization and Eggshells: Cell-Mediated Acellular Compartments of Mineralized Extracellular Matrix. **International Review of Cytology**, v. 145, p. 217–250, 1 jan. 1993.

ARNER, J. W.; SANTROCK, R. D. A historical review of common bone graft material in foot and ankle surgery. **Foot & Ankle Specialist**, v.7, n.2, p. 143-151, 13 jan. 2014.

AZEVEDO, A.G.S.; STECKER, K.; GORGULHO, H. F. Efeito da temperatura em processo de sinterização de pós de hidroxiapatita. **Cerâmica**, v.61, n. 357, p. 52-59, 2015.

BAILEY, S.; KARSENTY, G.; GUNDBERG, C.; VASHISHTH, D. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. **Ann N Y Acad Sci**. 6. 2017

BASRALI, F.; ÜLKER, S. N.; KOÇER, G.; KARADAMAR, P. Ü.; ÖZYURT, D.; CENGİZ, M.; SENTÜRK, Ü. K. Effect of magnesium on vascular reactivity in NOS inhibition-induced hypertension. **Magnesium Research**, v.28 n. 2, p. 64-74, 2015.

BAUMHAUER, J.; PINZUR, M. S.; DONAHUE, R.; BEASLEY, W.; DI GIOVANNI, C. Site selection and pain outcome after autologous bone graft harvest. **American Orthopaedic Foot and Ankle Society**, v.35, n.2, p. 104-107, 20 dez. 2014.

BENALI, O.; ABDELMOULA, M.; REFAIT, O.; GENIN, J. M. R. Effect of orthophosphate on oxidation products Fe(II) - Fe(III) hydroxycarbonate: The transformation of green rust to ferrihydrite. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 65, n.11, p. 1715-1726, 2001.

BENARAF, A.; KACIMI, M.; GHARBAGE, S.; MILLET, M. M.; ZIYAD, M. Structural and spectroscopic properties of calcium - iron $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ phosphate. **Materials Research Bulletin**, v.35, p. 2047-2055, 2000.

BERARI, R.A.; BHARALI, P.; DAS, B.K. Controlled synthesis of α and γ Fe_2O_3 nano particles via thermolysis of PVA gels and studies on α - Fe_2O_3 catalyzed sterene epoxidation. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 21, s.21, s. 170-178, jan 2017.

BODSTEIN, A.; LIMA, V. V. A.; BARROS, A. M. A. A vulnerabilidade do idoso em situações de desastres: necessidade de uma política de resiliência eficaz. **Ambiente e Sociedade**, v.17, n. 2, p. 157-174, 2014.

BORGES, J. F. P.; DE OLIVEIRA CALVET, C. A aplicação de células-tronco na odontologia. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 6, n. 1, p. 103–113, 2015.

BOSE, S.; FIELDING, G.; TARAFDER, S.; BANDYOPADHYAY, A. Understanding of Dopant-Induced Osteogenesis and Angiogenesis in Calcium Phosphate Ceramics. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 10, p. 594–605, 1 out. 2013.

BOSE, S.; VAHABZADEH, S. Effects of Iron on Physical and Mechanical Properties, and Osteoblast Cell Interaction in β -Tricalcium Phosphate. **Annals of Biomedical Engineering**, n.3, v.45, p.819-828, 2017.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: ww2.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/notatecnica.html

BRIER, B.; VINH, P.; SCHUSTER, M.; MAYFORTH, H.; JOHNSON CHAPIN, E. A Radiologic Study of an Ancient Egyptian Mummy with a Prosthetic Toe. **The Anatomical Record**, v. 298, n. 6, p. 1047–1058, 1 jun. 2015.

CAMPANA, V.; MILANO, G.; PAGANO, E.; BARBA, M.; CICIONE, C.; SALONNA, G.; LATTANZI, W.; LOGROSCINO, G. Bone Substitutes in Orthopaedic Surgery: From Basic Science to Clinical Practice. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 10, p. 2445–2461, 1 out. 2014.

CARRODEGUAS, R.; AZA, S. D. alfa tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v.7, p. 3536-3546, 16 jun. 2011.

CAZALBOU, s.; COMBES, C.; EICHERT, D.; REY, C. Adaptive physico-chemistry of bio-related calcium phosphates. **Journal of Materials Chemistry**, v.14, p. 2148-2153, 4 jun 2004.

CHEN, Y.; WHETSTONE, H. C.; LIN, A. C.; NADESAN, P.; WEI, Q.; POON, R.; ALMAN, B. A. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. **PLoS Med**, v. 4, n. 7, p. e249, 2007.

CRUZ, M. **Regeneração Guiada Tecidual**. São paulo: Santos, 2006.

DAVISON, N. L.; LUO, X.; SCHOENMAKER, T.; EVERTS, V.; YUAN, H.; BARRERE-DE GROOT, F.; DE BRUIJN, J. D. Submicron-scale surface architecture of tricalcium phosphate directs osteogenesis in vitro and in vivo. **Eur Cell Mater**, v. 27, n. 2, 2014.

DENNIS, J. E.; XIAO, S.-Q.; AGARWAL, M.; FINK, D. J.; HEUER, A. H.; CAPLAN, A. I. Microstructure of Matrix and Mineral Components of Eggshells from White Leghorn Chickens (*Gallus Gallus*). **Journal of Morphology**, v. 228, n. 3, p. 287–306, 1 jun. 1996.

DESTAIVILLE, A.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLANT, D.; LABORDE, E. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. *Materials Chemistry and physics*, v.80, p. 269-277, 2003.

DICKENS, B.; SCHROEDER, L. W. ; BROWN, W. E. Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. **Journal of Solid State Chemistry**, v.10, p. 232-248, 1974.

DOROZHKIN, S. Calcium phosphates bioceramics. **Ceramics International**, v.41, p. 13913-13966, Moscow, Aug. 2015

DUARTE, D.L.; SHAEFFER, L. Comparação da resistência à compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**. n.16, p.89-93, 2000.

ELIAZ, N.; METOKI, N.; Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. **Materials**, v.10, n. 334, p.1-104, 34 mar. 2017.

ELIAS, C. N.; VASCONCELLOS, V. S. L.; RESENDE, C. R. S. Análise dos mecanismos celulares durante osseointegração dos implantes. In: **CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃO ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS**, 2012, Natal. *Anais...* Natal, RN, 2012.

FEINBERG, A.W.; WILKERSON, W. R.; SEEGERT, C. A.; GIBSON, A. L.; HOIPKEMEIER-WILSON, L.; BRENNAN A. B. Systematic variation of microtopography, surface chemistry and elastic modulus and the state dependent effect on endothelial cell alignment. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 86A, n 2, p. 522–534 , 2008.

FARIA, M. H. A.; SILVA, G.; LAMAS, Q. Q. Estudo da necessidade de desenvolvimento de materiais para implantes ósseos de baixo custo econômico. **The 4th international Congress - University Industry Cooperation**, São Paulo, dez. 2012.

FERMAN, M. K. S. Tendências da Pesquisa e Desenvolvimento em Próteses Ortopédicas. 2015. 164f. Tese (Tese de Doutorado em processos químicos e bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2015.

FIELDING, G. A.; MANGAL, R.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings. **Acta Biomaterialia**, v.8, p. 3144-3152, 7 abr. 2012.

FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G. R. da S.; SASSO-CERRI, E.; SIMÕES, M. J.; CERRI, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015a.

FRASNELLI, M.; SGLAVO, V. M. Effect of Mg²⁺ doping on beta–alpha phase transition in tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. **Acta Biomaterialia**, v. 33, p. 283–289, 15 mar. 2016.

FRIEDLAENDER, G. E.; MARKIN, H. J.; GOLDBERG, V. M. Bone graft and bone graft substitutes - monograph series. **American Academy of Orthopaedic Surgeons**, n.32, 2006.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33 n.6, p.1352-1358, mai, 2010.

GUTIERRES, M.; LOPES, M. A.; HUSSAIN, N. S.; CABRAL, A. T.; ALMEIDA, L.; SANTOS, J. D. Substitutos Ósseos: conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de medicina**, v. 19, n. 4, p. 153–162, 2005.

GOMES, L. C.; DI LELLO, B. C.; CAMPOS, J.; B. SAMPAIO M. Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca do ovo da galinha. **Ceramica**, v.58 p. 448-452, 2012.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, n. 26, p. 3995-4021. 2005.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; HAN, S. S.; KANG, I. K. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. **Royal Society of Chemistry**, v.7, p.7442-7458, 2017.

HE, F.; QIAN, G.; REN, W.; KE, J.; FAN, P.; SHI, X.; CHENG, Y.; WU, S.; DENG, X.; YE, J. Preparation and Characterization of Iron/ β -Tricalcium Phosphate Bio-Cermets for Load-Bearing Bone Substitutes. **Ceramics International**, v. 43, n. 11, p. 8348–8355, ago. 2017.

HOLZAPFEL, B. M.; REICHERT, J. C.; SCHANTZ, J.-T.; GBURECK, U.; RACKWITZ, L.; NÖTH, U.; JAKOB, F.; RUDERT, M.; GROLL, J.; HUTMACHER, D. W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Review**, v.65, n.4, p. 581-603, 2013.

HOONNIVATHANA, E.; PANKAEW, P.; KLUMDOUNG, LIMSUWAN P.; NAEMCHANTHARA, K. Synthesis of Nanocrystalline β - Tricalcium Phosphate from Chicken Eggshells by Precipitation Method. **Advanced Materials Research**, v. 506 p. 86-89, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION: ISO 10993-1: Biological evaluation of medical devices - part 1: Evaluation and testing within the risk management process - 2003.

JIRAMALI, H. D.; CHAUDHARI, B. C.; KHANDERAY, J. C.; JOSHI, S. A.; SINGH, V.; PATIL, A. M. Waste Eggshell-Derived Calcium Oxide and Nanohydroxyapatite Biomaterials for the Preparation of LLDPE Polymer Nanocomposite and Their Thermomechanical Study. **Polymer-Plastics Technology and Engeneering**, p. 1-8, 2017.

KABIR, S. F.; AHMED, S.; MESTABA, A. I.; AHSAN, M.; ISLAM, S. Synthesis and characterization of Fe-doped hydroxyapatite. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**. v.47, n.1, p.1-8, 2012.

KAMKUM, P.; ATIWONGSANGTHONG, N.; MUANGHLUA, R.; VITTAYAKORN, N. Application of chicken eggshell waste as a starting material for synthesizing calcium niobate ($\text{Ca}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$) powder. **Ceramics. International**, v. **41**, S1), S69–S75, 2015.

KANNAN, S.; VENTURA, J. M.; FERREIRA, J. M. F. Aqueous precipitation method for the formation of Mg-stabilized β -tricalcium phosphate: An X-ray diffraction study. **Ceramics International**, v.33, p.637-641, fev. 2007.

KANG, D. J.; PAL, K.; PARK, S. J.; BANG, D. S.; KIM, J. K. Effect of eggshell and silk fibroin on styrene-ethylene/butylene-styrene as bio-filler. **Materials and Design**, v.31, p. 2216-2219, 2010.

KARSENTY G. Update on the Biology of Osteocalcin. **Endocr Pract**. 23(10):1270-1274. 2017.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v.23, n. 4,p. 518-522, 10 fev. 2000.

KOBAYASHI, Y.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N. Action of RANKL and OPG for Osteoclastogenesis. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 19, n. 1, p. 61–72, 2009.

KONTIS, V.; BENNETT, J. E.; MATHERS, C. D.; LI, G.; FOREMAN, K.; EZZATI, M. Future Life Expectancy in 35 Industrialised Countries: Projections with a Bayesian Model Ensemble. **The Lancet**, v. 389, n. 10076, p. 1323–1335, abr. 2017.

KUMAR, G. S.; THAMIZHAVEL, A.; GIRIJ, E. K. Microwave conversion of eggshell into flower-like hydroxyapatite nanostructure for biomedical applications. **Material letters**, v. 76, n.1, p. 198-200, 2012.

KUMAR, N. P.; MISHRA, K., S.; KANNAN, S.; Structural elucidation and iron oxidation states in situ formed $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ composites. **Journal of American Ceramic Society**, p.1-11, 2016.

LASSOUED, A.; DKHIL, B.; GADRI, A.; AMMAR, S. Control of the shape and size of iron oxide (α -Fe₂O₃) nano particles synthesized through the chemical precipitation method. **Results in physics**, v.7, p. 3007-3015, 2017.

LAZORYAK, B. I.; MOROZOV, V. A.; BELIK, A. A.; KHASANOV, S. S.; SHEKHTMAN, V. S. Crystal Structures and Characterization of Ca₉Fe(PO₄)₇ and Ca₉FeH_{0.9}(PO₄)₇. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 15–21, 15 fev. 1996.

LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1999.

LeGEROS, R. Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. **Clinical Materials**, v. 14, p. 65-88, 1993.

LEWIS, G. Properties of Open-Cell Porous Metals and Alloys for Orthopaedic Applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 10, p. 2293–2325, 1 out. 2013.

LIBONATI, F.; VERGANI, L. Understanding the structure–property relationship in cortical bone to design a biomimetic composite. **Composite Structures**, v. 139, p. 188–198, 1 abr. 2016.

LIPPENS, D. F.; NALLAPANENI, A.; SHANKEY, M. D. Exploring the use of unprocessed waste chicken eggshell for UV-protective. **Sustainability**, v.9, n. 2, p. 232-250, 2017.

LIU, Y.; DANG, Z.; WANG, Y.; HUANG, J.; LI, H. Hydroxyapatite/Graphene-Nanosheet Composite Coatings Deposited by Vacuum Cold Spraying for Biomedical Applications: Inherited Nanostructures and Enhanced Properties. **Carbon**, v. 67, p. 250–259, fev. 2014.

LYNDON, J. A.; BOYD, B. J.; BIRBILIS, N. Metallic implant drug/device combinations for controlled drug release in orthopaedic applications. **Journal of Controlled Release**, v. 179, p. 63–75, 10 abr. 2014.

MADEIRA, V.S.; BAPTISTTELLA, A.M.S.; ARAÚJO, A.A.D. Obtenção de nanopartículas de óxidos de ferro(goetita e hematita) e avaliação de suas propriedades adsorptivas. **XX congresso brasileiro de engenharia química**, p. 1-8, Florianópolis, 2014

MALDONADO, J.; GADELHA, C. A. G.; VARGAS, M.; COSTA, L.S.; QUENTAL, C. O subsistema de base mecânica, eletrônica e de materiais do complexo econômico industrial da saúde: perspectivas para 2022/2030. **Fundação Oswaldo Cruz**, v. 5, p. 81-117, 2013

MANSUR, H. S.; ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. de M. **Biomateriais Fundamentos e Aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

MANTRIPRAGADA, V. P.; LECKA-CZERNIK, B.; EBRAHEIM, N. A.; JAYASURIYA, A. C. An Overview of Recent Advances in Designing Orthopedic and Craniofacial Implants. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 11, p. 3349–3364, 1 nov. 2013.

MEEDER, P. J.; EGGERS, C. The history of bone grafting. **Injury**, v.25, supl. 1: A2-3, 1994.

MURAKAMI, F. S.; RODRIGUES, P. O.; CAMPOS, C. M. T. C.; SILVA, M. A. S. Estudo físico-químico do carbonato de cálcio a partir da casca do ovo da galinha. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 27, n.3, 2007.

NAVARRO, R. F. A evolução dos materiais. parte1: da pré-história ao início da era moderna. **Revista eletrônica de materiais e processos**, v. 1, n. 1, p. 01–11, 2006.

OLIVEIRA, D. A.; BENELLI, P.; AMANTE, E. R. A Literature Review on Adding Value to Solid Residues: Egg Shells. **Journal of Cleaner Production**, v. 46, p. 42–47, mai 2013.

OLSEN, S. L.; SHIPMAN, P. Surface modification on bone: trampling versus butchery. **Journal of Archaeological Science**, v. 15, n. 5, p. 535–553, 1988.

OLSON, G. B. Beyond discovery: design for a new material world. **Calphad**, v.25, n.2, p. 175-190, 2001.

ORYAN, A.; ALIDADI, S.; MAFFULLI, N.; MOSHIRI, A. Bone Regenerative Medicine: classic options novel strategies, and future directions. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v.9, n. 18, p. 2-27, 2014.

PANSERI, S.; MONTESI, M.; SANDRI, MONICA.; LAFISCO, M.; ADAMIANO, A.; GHETTI, M.; CENACCHI, G.; TAMPIERI, A. Magnetic labelling of stem cells with iron doped hydroxyapatite nanoparticles as tool for cell therapy. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.12, p. 909-921, 2016.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. BIOMATERIALS: TYPES, APPLICATIONS, AND MARKET. **Química Nova**, v. 38, n.7, p. 957–971, 2015.

PONTUAL, M. A. B.; MAGINI, R. de S. **Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de Crescimento - das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica**. São Paulo: Santos, 2004.

QUERIDO, W.; ROSSI, A. L.; FARINA, M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. **Micron**, v. 80, p. 122–134, 1 jan. 2016.

RADHA, R.; SREEKANTH D. Insight of magnesium alloys and composites for orthopaedic implants applications - a review. **Journal of Magnesium and Alloys**, p. 1-27, Aug. 2017

RENAUDIN, G.; GOMES, S.; NEDELEC, J. M. First row transition metal doping in calcium phosphate bioceramics: A detailed crystallographic study. **Material**, v.10, n. 92, 30 nov. 2017.

ROBBINS, S.; LAURYSSSEN, C.; SONGER, M. N.; Use of nonocrystalline hydroxyapatite with autologous BMA and local bone in lumbar spine. *Clinical Spine Surgery*, v.30, n.3, p. 192-197, 2017.

RODRIGUES, L. B. Aplicações de biomateriais em ortopedia. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v.9, n.2, p. 63-76, 2013.

ROUSSEL, J. B. **Química geral 2 ed. vol. II**. São Paulo: McGraw-Hill, 1994.

SAIDAK, Z.; MARIE, P. J. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 136, n. 2, p. 216–226, 1 nov. 2012.

SALAZAR, M. V. G. Effect of boron on the differentiation of mesenchymal stem cells. 2015. 44f. (grado em Biotecnologia) Universitat Politècnica de València, València. 2015.

SCHAAFSMA, A.; VAN DOORMAAL, J. J.; MUSKIET, G. J.; PARKAN, I.; VAN DER VEER, E . Positive effects of a chicken eggshell powder-enriched vitamin-mineral supplement on femoral neck bone mineral density in healthy late post-menopausal Dutch women. **British Journal of Nutrition**, v.87, n.3, p.267-275, 2002.

SERGEeva, N. S.; SVIRIDOVA, I. K.; FRANK, G. A.; KIRSANOVA, V. A.; AKHMEDOVA, S. A.; POPOV, A. A. Criteria of Biocompatibility of Materials for Bone Defect Repair. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 157, n. 5, p. 689–694, set. 2014.

SHERBY, O. D.; WADSWORTH, J. Ancient blacksmiths, the Iron Age, Damascus steels, and modern metallurgy. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 117, n. 3, p. 347–353, 2001.

SINGH, R.; SRIVASTAVA, M.; PRASAD, N. K.; AWASTHI, S.; DHAYALAN, A.; KANNAN, S. Iron doped tricalcium phosphate: Synthesis, characterization, hyperthermia effect, biocompatibility and mechanical evaluation. **Materials Science and engineering**. Abr, 2017.

SMITH, W. F.; HASHEMI, J. Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais. Porto Alegre. Mc Graw-Hill, 2006.

SNEHA, M.; SUNDARAM, N. M. Preparation and characterization of an iron oxide-hydroxyapatite nanocomposite for potential bone cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. Suppl 1, p. 99–106, 1 out. 2015.

SOARES, G. A. Estudo estratégico de ciência, tecnologia e inovação. **Fórum de biotecnologia e biomateriais**. UFRJ, 2005

SOLEDAD FERNANDEZ, M.; MOYA, A.; LOPEZ, L.; ARIAS, J. L. Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation. **Matrix Biology**, v. 19, n. 8, p. 793–803, jan. 2001.

STEVANOVIC, M. The age of clay: The social Dynamics of house destruction. v. 16, n. AA970310, p. 334–395, maio 1997.

SURYANARAYANA, C. X-Ray Diffraction: A Practical Approach. New York: Springer Science+Business Media, 1998.

TAMPA, M.; HANGAN, T. Biomaterials and skin tissue engineering. **House hold and Personal care Today**. v. 9 n.1, p. 40–42, fev. 2014.

TAVARES, D. D.; CASTRO, L.O.; SOARES, G. D. A.; ALVES, G. G.; GRANJEIRO, J. M. Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted β -tricalcium phosphate. **Journal of applied oral science**, v.21, n. 1, p. 37-42, jan. 2013.

THOMAS, M. V.; PULEO, D. A.; AL-SABBAGH, M. Calcium sulfate: a review. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, v. 15, n, 6, p. 599-607, 2005.

TORRES, P.M.C.; ABRANTES, J.C.C.; KAUSHAL, A.; PINA, S.; DÖBELIN, N.; BOHNER, M.; FERREIRA, J.M.F. Influence of Mg-doping calcium pyrophosphate impurities and cooling rate on the allotropic $\alpha \rightarrow \beta$ -tricalcium phosphate phase transformations. **Journal of the European Ceramic Society**, p.1-11, sep. 2015.

TRAN, N.; WEBSTER, T. J. Increased osteoblast functions in the presence of hydroxyapatite-coated iron oxide nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v.7, p. 1298–1306, 2011.

TSAI, W. T.; YANG, J. M.; LAI, C. W.; CHENG, Y. H.; LIN, C. C.; YEH, C. W. Characterization and adsorption properties of eggshell membrane. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 488-493, 2006.

VAHABZADEH, S.; BOSE, S. Effects of iron on physical and machanical properties and osteoblst cell interaction in β -tricalcium phosphate. **Biomedical Engineering Society**, v. 45, n.3 p.819–828, 2017.

VAN LIESHOUT, E. M. M.; ALT, V. Bone graft substitutes and bone morphogenetic proteins for osteoporotic fractures: what is the evidence? **Injury**, Osteoporotic fractures – the biological perspective. v. 47, Supplement 1, p. S43–S46, jan. 2016.

VOGEL, A. I. **Química analítica qualitativa**, vol. II. São Paulo: Mestre Jou, 1981.

WAUQUIER, F.; LEOTOING, L.; COXAM, véronique; WITTRAND, Y. **Oxidative stress in bone remodeling and disease**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/sci-hub.cc/10.1016/j.molmed.2009.08.004>>. Acesso em: 8 jun. 2017.

WEI, J.; SHIMAZU, J.; MAKINISTOGLU, M. P.; MAURIZI, A.; KAJIMURA, D.; ZONG, H.; TAKARADA, T.; LEZAKI, T.; PESSIN, J. E.; HINOI, E.; KARSENTY, G. Glucose

Uptake and Runx2 Synergize to Orchestrate Osteoblast Differentiation and Bone Formation. **Cell**. 18;161(7):1576-1591. 2015.

WU, S. C.; HO, W. F.; HSU, S. K.; HUNG, C. W.; HSU, H. C. Calcium phosphate bioceramics synthesized from eggshell powders through a solid state reaction. **Ceramics International**. v.39, p. 6467-6473, 2013

YAMAZAKI, K.; HAGIWARA, H. Excess of iron inhibits osteoblast metabolism. **Toxicology Letters**, n. 191, p.211-215, 2009

ZABEU, J. L. A.; MERCADANTE, M. T. Substitutos ósseos comparados ao enxerto ósseo autólogo em cirurgia ortopédica - Revisão sistemática da literatura. **Revista Brasileira de Ortopedia**, n.43, n.3, p. 59-68, 2008

ZHAO, D.; WITTE, F.; LU, F.; WANG J.; LI, J.; LING Q.; Current status on clinical application of magnesium-based orthopaedic implants: A review from clinical translational perspective. **Biomaterials**, v.112, p. 287-302, jan. 2017.

ZHANG, J.; SHI, H. S.; LIU, J. Q.; YU, T.; SHEN, Z. H.; YE, J.D. Good hydration and cell-biological performances of superparamagnetic calcium phosphate cement with concentration-dependent osteogenesis and angiogenesis induced by ferric iron. **Journal of Material Chemistry**, n.3, p. 8782-8795, 2015

ZILM, M. E.; CHEN, L.; SHARMA, V.; MCDANNALD, A.; JAIN, M.; RAMPRASAD, R.; WEI, M. Hydroxyapatite Substituted by Transition Metals: Experiment and Theory. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 18, n. 24, p. 16457–16465, 2016.

ZOU, L.; LAI, H.; ZHOU, Q.; XIAO, F. Lasting controversy on ranibizumab and bevacizumab. **Theranostics**, v. 1, p. 395–402, 2011.