

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSAMENTO DE MATERIAIS E
CATÁLISE

Priscila Maria Sarmeiro Correa Marciano Leite

**OBTENÇÃO DE CIMENTO DE ALUMINATO DE CÁLCIO ASSOCIADO COM
ADITIVOS RADIOPACOS PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

São José dos Campos
2017

Priscila Maria Sarmeiro Correa Marciano Leite

**obtenção de cimento de aluminato de cálcio associado com aditivos
radiopacos para aplicação biomédica**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado Profissional em Processamento de Materiais e Catálise, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de mestre em Processamento de Materiais e Catálise.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ivone Regina de Oliveira

São José dos Campos
2017

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Leite, Priscila Maria Sarmeyro Correa Marciano

Obtenção de cimento de aluminato de cálcio associado com aditivos radiopacos para aplicação biomédica / Priscila Maria Sarmeyro Correa Marciano Leite; orientadora, Ivone Regina de Oliveira. - São José dos Campos, SP, 2017.

1 CD-ROM, 74 p.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais e Catálise.

Inclui referências

1. Processamento de Materiais e Catálise. 2. Cimento de aluminato de cálcio. 3. Radiopacidade. 4. Viabilidade celular. 5. Viabilidade bacteriana. I. Oliveira, Ivone Regina de, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais e Catálise. III. Título.

Eu, Priscila Maria Sarmeyro Correa Marciano Leite, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 6 de Novembro de 2017.



Autor(a) da Obra

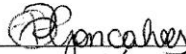
Data da defesa: 27/09/201

PRISCILA MARIA SARMEIRO CORREA MARCIANO LEITE

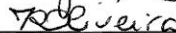
**“OBTENÇÃO DE CIMENTO DE ALUMINATO DE CÁLCIO ASSOCIADO
COM ADITIVOS RADIOPACOS PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais e Catálise, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

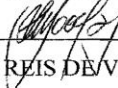
PROF.^a DR.^a ERIKA PETERSON GONÇALVES



PROF.^a DR.^a IVONE REGINA DE OLIVEIRA



PROF. DR. LIU YAO CHO



PROF.^a DR.^a LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS (Unesp)



Prof. Dr. Leandro José Raniero

Diretor do IP&D – Univap

São José dos Campos, 27 de Setembro de 2017.

DEDICATÓRIA

A Deus, minha família, amigos, colegas de trabalho e orientadora pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida.

À Professora Dra. Ivone Regina de Oliveira, pela oportunidade de aprendizado durante esses dois anos, por ser um exemplo de profissional que, com sua postura rigorosa, ensinou-me o verdadeiro significado de uma pesquisa. Muito obrigada pela confiança e apoio. A competência com a qual me orientou contribuiu muito para o meu amadurecimento profissional.

Aos professores do programa de mestrado profissional em Materiais e Catálise.

Aos meus colegas de turma.

A todos os funcionários da Universidade do Vale do Paraíba, em especial aos funcionários do IP&D.

Ao Professor Walter Miyakawa, pela amizade e apoio.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando.

À minha família maravilhosa, por estar sempre me guiando e me ajudando para realização dos meus sonhos, e à qual dedico esta minha conquista.

“Construa suas esperanças em coisas eternas”

William M. Branham

OBTENÇÃO DE CIMENTO DE ALUMINATO DE CÁLCIO ASSOCIADO COM ADITIVOS RADIOPACOS PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA

RESUMO

Considerando que biomateriais para tratamento ortopedicos devem apresentar alta resistência mecânica devido às tensões que irão enfrentar, a composição de cimento de aluminato de cálcio (CAC) contendo ZnO (4%) tem se mostrado promissora, apresentando um desempenho similar ou ligeiramente superior ao polimetilmetacrilato (PMMA) cimento para a reconstrução óssea. No entanto, esta composição não apresentou radiopacidade apropriada o que constitui outra importante propriedade necessária para alguns tratamentos de fratura vertebral. Nestas aplicações o cimento é injetado na fratura, assim a identificação adequada do biomaterial após a aplicação é fundamental para evitar que o material vaze na espinha ou veias. Neste trabalho, composições de aluminato de cálcio contendo aditivos radiopacos (ZnO, Ag e Bi₂O₃) foram produzidas e avaliadas quanto a radiopacidade, resistência mecânica, porosidade aparente, distribuição de tamanho de poros, bioatividade e viabilidade celular e bacteriana. A capacidade de precipitação de apatita *in vitro* (bioatividade) foi avaliada por meio de medições de pH e de concentração de cálcio em solução de fluido corporal simulado (SBF) para as amostras previamente tratadas ou não com solução de silicato de sódio (SS). A superfície das amostras após o tratamento em SBF ou SBF/SS foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise por energia dispersiva de raios X (EDS) e espectroscopia Raman confocal. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT e atividade de fosfatase alcalina (ALP). A viabilidade bacteriana por medidas de densidade óptica. Os resultados de radiopacidade confirmaram que as composições CACH-Ag (25:1 %-p) e ZnO-Bi₂O₃ (15:10 %-p) apresentam valores adequados de radiopacidade (≥ 3 mm alumínio). Todas as composições avaliadas apresentaram redução de tamanho de poros após a interação com SBF, indicando a precipitação de apatita na superfície dos materiais, que pode preencher os poros. Os resultados de MEV confirmaram que a precipitação de fases ocorreu na superfície das amostras. A identificação de cálcio e principalmente fósforo por EDS e a presença da assinatura Raman a 960 cm^{-1} , correspondente ao grupo fosfato, confirmou a formação de uma camada de apatita sobre a superfície das amostras após imersão em SBF ou SBF/SS. Em relação aos resultados de viabilidade de células osteoblásticas, as composições ZnO (25%-p), ZnO-Ag e ZnO-Bi₂O₃ apresentaram viabilidade celular ligeiramente inferior comparado ao controle. As composições não apresentaram diferenças qualitativas significativas para a atividade de ALP. As composições revelaram efeito bacteriostático mais eficaz contra o microrganismo *S. aureus* quando comparado a *E. coli*, avaliadas nas composições estudadas.

Palavras-chave: Cimento de aluminato de cálcio. Radiopacidade. Bioatividade. Viabilidade celular. Viabilidade bacteriana.

OBTAINMENT OF CALCIUM ALUMINATE CEMENT ASSOCIATED WITH RADIOACTIVE ADDITIVES FOR BIOMEDICAL APPLICATION

ABSTRACT

Considering that biomaterials for orthopedic treatments must present high mechanical resistance due to the stresses they will face, the composition calcium aluminate cement (CAC)-based containing ZnO (4 wt%) has shown promising, resulting in similar or a slightly better performance than polimetilmetacrilato (PMMA) (cement for bone reconstruction). However, this CAC-base blend did not present suitable radiopacity which constitutes other important property required for some vertebral compression fracture treatments that consider cement injections, as proper identification of the biomaterial after application is fundamental to prevent the material leaking to the spine or veins. In this work, calcium aluminate cement-based compositions containing radiopacific additives (ZnO, Ag and Bi₂O₃) were evaluated as radiopacity, mechanical strength, apparent porosity, pore size distribution, bioactivity, cell viability and bacterial viability. The *in vitro* apatite-formation ability (bioactivity) was evaluated by means of pH and calcium concentration measurements in the simulated body fluids (SBF) for samples previously treated or not with sodium silicate (SS) solution. The surface of the samples after treatment in SBF or SBF/SS was analyzed by scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray (EDX) analysis and Confocal Raman spectroscopy. Cell viability was evaluated through MTT assay, and bioactivity was assessed by alkaline phosphatase (ALP) activity assay. Radiopacity results confirmed that the CAC-based compositions containing ZnO-Ag (25:1 wt%) and ZnO-Bi₂O₃ (15:10 wt%) present suitable values of radiopacity (> 3 mm aluminum). All compositions evaluated also presented pore size decrease after the samples interaction with SBF indicating apatite precipitation on the materials' surface, which might coat the solid surface and fill in the pores. SEM results confirmed that precipitation of phases occurred on blends samples surface. The identification of calcium and mainly phosphorus by EDX and the presence of the Raman signature at 960 cm⁻¹ corresponding to the phosphate group confirmed the formation of an apatite-like layer on samples surfaces after immersion in SBF or SBF/SS. Regarding the osteoblastic cell viability results, CAC-blend containing 25 wt% ZnO, ZnO-Ag and ZnO-Bi₂O₃ presents slightly lower cell viability compared to control. The compositions do not present qualitatively significant differences for ALP activity. The compositions proved more effective bacteriostatic effect against *S. aureus* microorganism compared to *E. coli*, evaluated in the compositions studied.

Keywords: Calcium aluminate cement. Radiopacity. Bioactivity. Cell viability. Bacterial viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aplicação de biocerâmicas.....	19
Figura 2: Diagrama de fase para o sistema binário Al ₂ O ₃ -CaO.	21
Figura 3: Fluxograma de preparação das composições estudadas	31
Figura 4: Distribuição de tamanho de partículas dos aditivos radiopacos: ZnO, Ag e Bi ₂ O ₃ , comparado ao CAC.....	39
Figura 5: Valores médios de radiopacidade, expressos em espessura equivalente de alumínio (mm Al) e densidade óptica das composições avaliadas.....	40
Figura 6: Tamanho de grãos Óxido de Bismuto (Bi ₂ O ₃) e Óxido de zinco(ZnO)	41
Figura 7: Resistência mecânica à compressão uniaxial das composições avaliadas, após contato com solução SBF, durante sete dias.	42
Figura 8: Porosidade aparente das composições avaliadas, antes e após tratamento com solução SBF, durante sete dias. Valores.....	43
Figura 9: Distribuição de tamanho de poros das composições avaliadas (a) antes e (b) após contato com solução SBF, durante sete dias.	44
Figura 10: Microscopia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra CACH, após contato com SBF por 21 dias.	46
Figura 11: Microscopia eletrônica de varredura e espectro EDS para a amostra CACH após contato com solução de silicato de sódio por 7 dias e SBF por 21 dias.	47
Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra CACH-ZnO (4%-p), após contato com SBF, por 21 dias.	48
Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra CACH-ZnO (4%-p), após contato com solução de silicato de sódio por 7 dias e SBF por 21 dias.....	49
Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura e espectro EDS para a amostra CACH-ZnO (25%-p), após contato com SBF por 21 dias.	50
Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra CACH-ZnO (25%-p), após contato com solução de silicato de sódio, por 7 dias e SBF por 21 dias.....	51
Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra de ZnO-Ag (25:1%-p), após contato com SBF por 21 dias.	52

Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra ZnO-Ag (25:1%-p), após contato com solução de silicato de sódio, por sete dias, e com solução de SBF, por 21 dias.....	53
Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra ZnO-Bi ₂ O ₃ (15:10%-p), após contato com SBF por 21 dias.....	54
Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura e espectro de EDS, para a amostra ZnO-Bi ₂ O ₃ (15:10%-p), após contato com solução de silicato de sódio por 7 dias, e SBF, por 21 dias.....	55
Figura 20: Variação de pH e concentração de íons Ca ²⁺ em SBF em função do tempo, para as composições estudadas sem tratamento prévio.....	57
Figura 21: Variação de pH e concentração de íons Ca ²⁺ em SBF em função do tempo, para as composições estudadas após tratamento com solução de silicato de sódio (SS) por 7 dias.....	58
Figura 22: Espectros Raman da superfície das composições estudadas após tratamento em SBF sem ou com tratamento prévio com solução de silicato de sódio (SS) por 7 dias.	60
Figura 23: Viabilidade celular de cultura de osteoblastos humanos (ATCC-HTB-85) após exposição direta às amostras, e ao DMSO (CN, controle negativo), ou não expostas (CP, controle positivo) durante 24 horas, apresentados como absorbância média ± desvio padrão, além do aspecto macroscópico da marcação por <i>Fast Red</i>	61
Figura 24: Medidas de densidade óptica de crescimento dos microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> , em contato com as composições estudadas. Valores apresentados como média ± desvio padrão.	64
Figura 25: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das composições estudadas após contato com os microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes usados na preparação de um litro de solução de fluido corporal simulado.....	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP = Atividade de fosfatase alcalina

ANOVA = Análise de variância

ASTM = Sociedade americana para testes e materiais (*American Society for Testing and Materials*)

CAC = Cimento de aluminato de cálcio

CACH = Cimento aluminato de cálcio homogêneo

CN = Controle negativo

CP = Controle Positivo

SBF = Solução de fluido corporal simulado

DAPI = 4'6-diamidino-2- -phenylindole

DMEM = Meio mínimo essencial modificado Dulbecco's

DMSO = Dimetilsulfóxido (*Dymethyl sulfoxide minimum*)

DO = Densidade óptica

E_a = Energia de ativação

EDS = Espectroscopia por dispersão de energia

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

GGTP = Gama-glutamil-transpeptidase (*Gama glutamyl transpeptidase*)

HA = Hidroxiapatita

HMDS = Hexamethyldisilazane

ISO = Organização internacional para padronização

LB = Luria Bertani Broth

MEM= Meio mínimo essencial

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

MMA = Metilmetacrilato

MTA = Agregado de trióxido mineral (*Mineral trioxide aggregate*)

MTT = Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio

PBS = Solução tampão fosfato-salino

pH = Potencial de hidrogênio

PMMA = polimetilmetacrilato

SFB = Soro fetal bovino

SS = Silicato de sódio

UV = Região ultravioleta do espectro eletromagnético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Biomateriais.....	18
3.2 Produção e hidratação de aluminatos de cálcio	20
3.3 Cimento de aluminato de cálcio (CAC) como biomaterial.....	24
3.4 Radiopacidade.....	26
3.5 Outras propriedades desejáveis para biomateriais	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Radiopacidade.....	32
4.2 Ensaio mecânico e porosidade aparente	33
4.3 Distribuição de tamanho de poros	34
4.4 Bioatividade.....	35
4.5 Viabilidade celular	36
4.6 Viabilidade bacteriana.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Radiopacidade.....	39
5.2 Resistência mecânica e porosidade aparente	41
5.3 Distribuição de tamanho de poros	43
5.4 Bioatividade.....	45
5.5 Viabilidade celular	61
5.6 Viabilidade bacteriana.....	63
6 CONCLUSÃO	67
7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	68
REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

Cerâmicas de aluminato de cálcio têm sido empregadas como material substituto ósseo desde 1970 quando foram primeiro avaliados para osso em implantes da raiz do dente. Embora originalmente empregado devido a sua relativamente alta resistência mecânica, alguns autores reportaram a formação de uma ligação íntima entre cerâmicas de aluminato de cálcio e tecidos. Conseqüentemente, uma gama de cerâmica de aluminato de cálcio têm sido avaliada para utilização como implantes (1).

Alguns estudos relatam aplicações de cimento de aluminato de cálcio (CAC) para reparar defeitos do osso, com base no fato da sua composição química e coeficiente de dilatação térmica serem semelhantes aos dos dentes e ossos humanos (2;3). Composições CAC-zircônia também foi desenvolvida para estabilizar fraturas nas vértebras sob compressão, conduzindo a valores de resistência mecânica semelhante ao cimento usado para a reconstrução óssea (PMMA, polimetilmetacrilato). Quando avaliada em vértebras de ovelhas, misturas à base de CAC mostraram menor inflamação e melhor adaptação ao tecido ósseo comparado ao PMMA (4).

Recentemente, foram avaliadas algumas propriedades do cimento de aluminato de cálcio quando combinado com alumina, zircônia, óxido de zinco, hidroxiapatita, fosfato tricálcico, quitosana e colágeno, comparando com os produtos comerciais aplicadas em odontologia (MTA, agregado de trióxido mineral) e (ionômero de vidro) e ortopedia (PMMA) (5). Particularmente, a mistura contendo óxido de zinco apresentou um desempenho ligeiramente melhor do que o PMMA. Considerando que os biomateriais para tratamentos de vértebras fraturadas tem que apresentar alta resistência mecânica devido às tensões que irão enfrentar (4), as composições que contêm óxido de zinco foram as mais promissoras (5). Além disso, composições contendo ZnO apresentaram efeito não-citotóxico e têm a capacidade de induzir a precipitação de compostos importantes para o processo de osteoatividade, quando na presença de uma solução de SBF. Não apenas $Zn_3(PO_4)_2$, mas também hidroxiapatita e outros fosfatos são gerados quando aplicado ZnO como um biomaterial (6).

No entanto, a composição CAC-ZnO (4% em peso) não apresentou radiopacidade apropriada (5). Radiopacidade é um requisito indispensável para

materiais cirúrgicos (dente e vértebras), uma vez que devem ser radiopacos para serem localizados com precisão, assim, dentistas podem identificar e delimitar a interface dente-restauração. Baixa radiopacidade de biomateriais podem levá-los a confundir a restauração com cáries ou vazios (7). Além disso, alta radiopacidade é necessária para alguns tratamentos de fratura de compressão vertebral que usam injeções de cimento. Neste caso, a identificação adequada do biomaterial após a aplicação é fundamental para evitar que o material vaze na espinha ou veias (4). A norma ISO 6876/2001 estabeleceu que os materiais de preenchimento endodônticos devem apresentar radiopacidade pelo menos 3,0 mm de alumínio. De acordo com ANSI/ADA, cimentos endodônticos devem ser pelo menos 2,0 mm de alumínio mais radiopacos que a dentina ou osso (8).

A radiopacidade de um material pode ser alterada pela adição de um teor adequado de partículas, contendo metais pesados, tais como o bismuto ($Z = 83$), prata ($Z = 47$) ou zinco ($Z = 30$) (9, 10). O óxido de zinco é usado em materiais odontológicos para fins protéticos e implantes e não apresenta toxicidade (11). Algumas formulações são predominantemente de óxido de zinco na qual prata é adicionada para aumentar a sua radiopacidade (12). O problema com esta formulação é que a prata pode causar a descoloração da dentina. Isto é problemático particularmente na cavidade de acesso coronal, e afeta a aparência do dente. Devido a isso, formulações de seladores dentais tem substituído a prata por compostos de bismuto (12). Óxido de bismuto é um agente radiopaco bem conhecido. O material reparador (MTA) apresenta elevado conteúdo de óxido de bismuto resultando em elevados níveis de radiopacidade como consequência da capacidade de absorção de raios X do bismuto (7). Embora o óxido de bismuto seja conhecido como um excelente radiopaco, algumas investigações relatam que este aditivo induz o aumento da porosidade e reduz a resistência mecânica dos materiais reparadores (13, 14).

Considerando esses aspectos, neste trabalho foram preparadas composições de cimento de aluminato de cálcio contendo aditivos radiopacos como ZnO-Ag (25:1% em peso) e ZnO-Bi₂O₃ (15:10 em peso%) em comparação com composições contendo apenas ZnO (4 e 25% em peso). Dessa forma, efeitos dos aditivos radiopacos puderam ser verificados não apenas na radiopacidade mas também em outras importantes propriedades visando aplicação como biomaterial. Estudos anteriores testaram várias concentrações de Ag, sendo a mais eficaz 1% em peso.

As composições de ZnO foram aumentadas afim de melhorar as propriedades quando, comparada a 4% e o Bi₂O₃ por apresentar boa radiopacidade.

2 OBJETIVOS

Avaliar as propriedades de cimento de aluminato de cálcio quando associado com aditivos radiopacos, visando sua aplicação como biomaterial. Este objetivo está vinculado aos objetivos específicos apresentados a seguir:

- avaliar a radiopacidade do cimento de aluminato de cálcio homogêneo puro ou associado a aditivos radiopacos por meio de medidas de densidade óptica;
- avaliar a resistência mecânica (compressão uniaxial) e a porosidade aparente (princípio de Arquimedes) das composições resultantes;
- avaliar a distribuição de tamanho de poros das composições resultantes, por meio de porosimetria de mercúrio;
- avaliar a bioatividade das composições resultantes, por meio de MEV, EDS e espectroscopia Raman;
- avaliar a viabilidade celular e bacteriana das composições resultantes, por meio de medidas de densidade óptica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

Biomateriais são materiais utilizados em contato com sistemas biológicos, cuja finalidade é reparar ou substituir tecidos, órgãos ou funções do organismo, de modo a manter ou melhorar a qualidade de vida do paciente (15).

Esses materiais podem ser classificados de acordo com a sua origem em: naturais (autógenos – paciente; alógenos – doador; ou xenógenos - animal) ou sintéticos/aloplásticos (metais, cerâmicas e polímeros), ou ainda de acordo com a resposta induzida ao meio biológico (bioinertes, bioabsorvíveis e bioativos) (15).

Durante sua aplicação, estes materiais podem apresentar três características básicas relacionadas à sua aplicação: (i) biocompatibilidade, não induzindo respostas biológicas adversas, como reações alérgicas e inflamatórias não toleráveis pelo organismo; (ii) alta osteocondutividade, estimulando o crescimento de células ósseas; e (iii) bioatividade, que é a capacidade do material se unir com o tecido biológico (15), além de apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos do hospedeiro, de modo a estimular as respostas adequadas no meio.

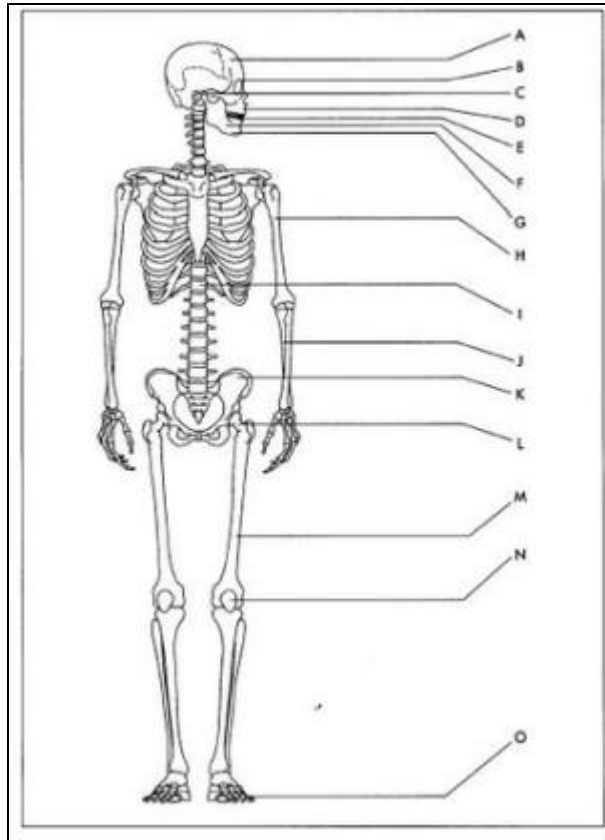
Além disso, este material deve ser de fácil esterilização seja por exposição a altas temperaturas, por vapor de óxido de etileno, ou radiação gama, e devem permanecer inalterados quando submetidos a uma destas técnicas (16). Também devem ser processados em variadas geometrias tridimensionais, pois muitas vezes são utilizados em defeitos com formas únicas, irregulares e complexos, logo os biomateriais devem ser de fácil e versátil fabricação (17).

Entre os biomateriais sintéticos, os materiais cerâmicos vêm ganhando destaque por apresentarem vantagens quanto às características de estética e biocompatibilidade (18), além de elevado módulo de elasticidade, elevada resistência à fratura por compressão, inércia química e resistência ao desgaste (19).

As cerâmicas, em destaque neste estudo, são usadas para reparar ou reconstruir partes do corpo e são denominadas biocerâmicas (20). Biocerâmicas são usadas geralmente para reparar o sistema esquelético, composto por ossos, juntas e dentes. Materiais cerâmicos comumente usados incluem zircônia, alumina,

hidroxiapatita e biovidro (21, 22). A Figura 1 apresenta uma variedade de aplicações das biocerâmicas (18).

Figura 1: Aplicação de biocerâmicas



Nota: A. reparos cranianos; B. lentes oculares; C. otorrinolaringologia; D. reconstrução maxilofacial; E. implantes dentários; F. aumento de rebordo alveolar; G. preenchimento de cavidade periodontal; H. acessos percutâneos; I. válvulas cardíacas; J. cirurgias de coluna; K. reparo de crista íliaca; L. preenchimento de cavidades ósseas; M. aplicações ortopédicas sobre carga; N. fixação ortopédica; O. articulações.

Fonte: (18)

Dentre as biocerâmicas, a hidroxiapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, pura vem sendo utilizada em procedimentos cirúrgicos na odontologia, onde há a necessidade de reparação óssea. Além disso, vem sendo utilizada quando combinado a outros cimentos endodônticos, na tentativa de melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas (23).

Os fosfatos de cálcio pertencem à classe de biocerâmicas chamadas cerâmicas ligadas quimicamente (CLQ), produzidas por reações químicas em baixas temperaturas, geralmente por combinação de um pó e um líquido (24). Silicatos de cálcio e aluminatos de cálcio são outros exemplos de CLQ.

Cimentos a base de fosfato de cálcio também vêm sendo utilizados para reparação de defeitos cranianos em seres humanos (25). Uma vantagem do uso dos cimentos é a possibilidade de preencher espaços vazios, no osso, de maneira uniforme.

Além da hidroxiapatita, os cimentos a base de aluminato de cálcio, tem sido estudados, visando preservar as propriedades positivas e aplicações clínicas de materiais utilizados na odontologia, mais especificamente na endodontia, superando as limitações apresentadas por esses materiais (26, 27).

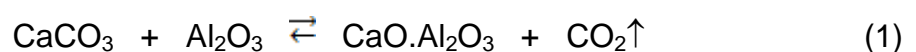
O cimento de aluminato de cálcio (CAC) também tem sido estudado como um cimento reparador em ortopedia, visto que sua biocompatibilidade já fora comprovada em testes realizados na odontologia (27).

O CAC, em destaque neste estudo, apresenta boa resistência mecânica e biocompatibilidade que o torna mais adequado frente a outros biomateriais, para aplicações onde carga é requerida, como nos tratamentos odontológicos e ortopédicos. Para o seu processamento ocorre alto consumo de água durante seu processo de cura, com tempos comparativamente curtos. Apresenta boa resistência mecânica, várias vezes superiores a do fosfato de cálcio, e também permite uma larga variação na consistência e formulação de composições, possibilitando uma grande variedade de aplicações (4, 26).

3.2 Produção e hidratação de aluminatos de cálcio

O aluminato de cálcio (CA) pode ser produzido através da sinterização de uma mistura de Al_2O_3 e CaCO_3 , ou através de um processo de calcinação dessa mistura a temperaturas entre $1315\text{ }^\circ\text{C}$ e $1425\text{ }^\circ\text{C}$, sendo esse último, o método mais viável para a produção de CA com composição uniforme. Na sinterização via fase líquida, os reagentes CaCO_3 e Al_2O_3 são submetidos à temperaturas entre $1450\text{ }^\circ\text{C}$ e $1550\text{ }^\circ\text{C}$, em fornos elétricos a arco (28). O aluminato de cálcio formado é resfriado e moído na granulometria desejada.

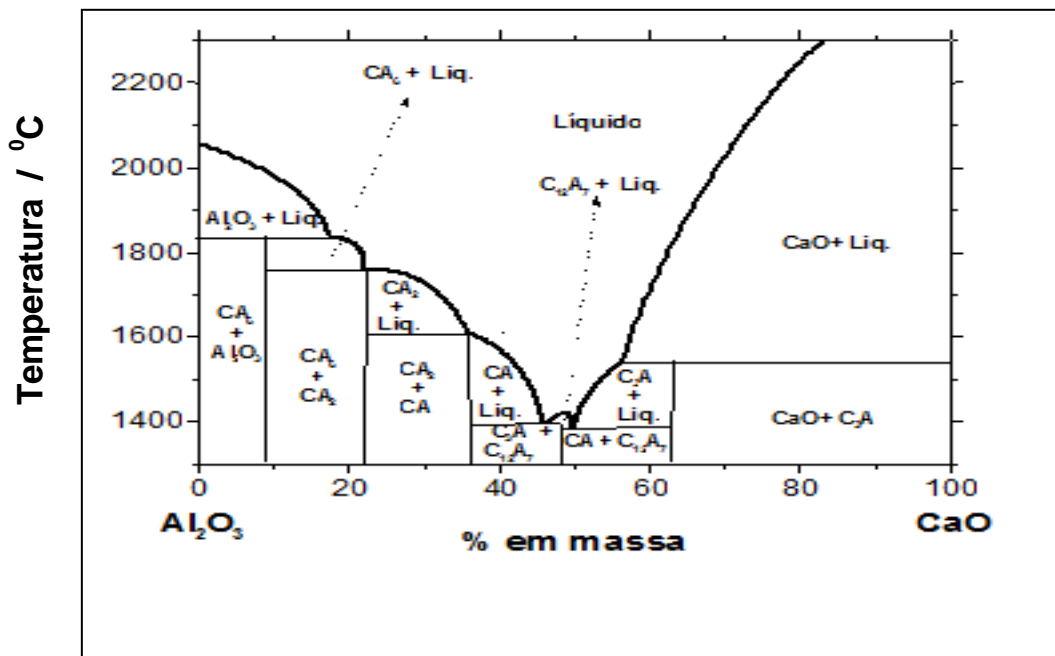
De uma forma geral a formação do CA pode ser descrita por meio da seguinte equação química (Equação 1).



Apesar da simplicidade da reação descrita acima, a formação do CA ocorre de uma maneira complexa. No início do processo de sinterização da mistura, formam-se fases cristalinas de aluminatos, com altos teores de Ca. Com o aumento da temperatura, mais CaO e Al_2O_3 reagem com os primeiros produtos formados, produzindo outras fases, com menores teores de cálcio. Durante o aquecimento, esta sequência de reações continua a ocorrer, como previsto no diagrama de fase binário Al_2O_3 -CaO, apresentado na Figura 2 (7).

Neste processo, a quantidade e o tipo de fase cristalina do aluminato de cálcio formado irá depender da razão entre CaO e Al_2O_3 na mistura, da temperatura alcançada e do procedimento de resfriamento do material obtido. O resfriamento interfere no tipo de fase cristalina formada uma vez que, dependendo do gradiente de temperatura dentro do bloco fundido, a cristalização ocorre em maior ou menor grau, como mostrado pelos caminhos de cristalização, apresentadas na Figura 2 (29).

Figura 2: Diagrama de fase para o sistema binário Al_2O_3 -CaO.



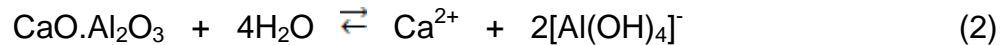
Fonte: (7, 29)

Nas condições de produção utilizadas atualmente, obtêm-se CA de alta pureza, com diferentes proporções entre as diversas fases cristalinas, dependendo da aplicação a que se destina este material (28). Estas fases apresentam distintas propriedades, no que se refere à reatividade em relação à água, já que, em geral, quanto maior a quantidade de CaO, maior a reatividade. As principais fases cristalinas comerciais são:

- a fase C_3A ($3CaO.Al_2O_3$), é a mais reativa entre as possíveis fases formadas. Entretanto, está presente em quantidades muito pequenas ou não é observada em cimentos de aluminato de cálcio, pois a produção de cimentos refratários é efetuada na presença de altos teores de alumina, o que dificulta a formação desta fase (30);
- a fase $C_{12}A_7$ ($12CaO.7Al_2O_3$), hidrata-se rapidamente e, por esse motivo, apesar de possuir temperatura de fusão por volta de ($1400\text{ }^\circ\text{C}$), pode ser utilizada para controlar o tempo de endurecimento de cimentos comerciais (30, 31);
- a fase CA ($CaO.Al_2O_3$), tem temperatura de fusão aproximadamente de ($1600\text{ }^\circ\text{C}$), mas hidrata-se mais lentamente, quando comparada com as fases C_3A e $C_{12}A_7$. Apesar disso, apresenta rápido endurecimento após o início do processo de hidratação (31);
- a fase CA_2 ($CaO.2Al_2O_3$), mais refratária, capaz de resistir a temperaturas maiores que a fase CA, requer um longo tempo para se hidratar. A presença desta fase pode acelerar o processo de endurecimento da fase CA, entretanto o efeito oposto não é observado (32);
- a fase CA_6 ($CaO.6Al_2O_3$), a única fase presente em sistemas formados por aluminato de cálcio que não se hidrata (31).

O aluminato monocálcico ($CaO.Al_2O_3$, $CaAl_2O_4$, CA) é a fase de aluminato de cálcio mais largamente usada como precursor do cimento de aluminato de cálcio (CAC) pois é o sal de aluminato de cálcio mais hidráulico, endurecendo na presença de água. Geralmente na mistura do pó de CA com a água forma-se uma pasta que endurece formando o cimento de aluminato de cálcio (1).

O processo de endurecimento (pega) inicia-se com a reação da fase CA com a água, formando íons cálcio (Ca^{2+}) e tetra-hidroxi aluminato $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ em solução. Descrita por meio da seguinte equação química (Equação 2).



Os íons $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ comportam-se como uma base, sendo uma pequena parte dissociada em íons Al^{3+} e OH^- . Este fenômeno é responsável pelo aumento do pH no meio. Descrita por meio da seguinte equação química (Equação 3).



Este processo de dissolução ocorre até que a solução atinja um nível de saturação suficiente para promover uma precipitação massiva, seguida do crescimento dos cristais dos compostos conhecidos como hidratos de aluminato de cálcio. Também proporciona a formação de uma rede interconectada, conferindo resistência mecânica ao corpo cerâmico. A velocidade de hidratação e de precipitação dos hidratos formados é fortemente dependente da composição cristalina do material de partida, bem como da estrutura dos produtos que se formam durante a precipitação. Este último aspecto é influenciado, principalmente, pelo teor de água disponível, pelo tempo de reação, pela temperatura, e pela relação entre as concentrações dos íons Ca^{2+} e $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$, que são geradas em solução durante o processo de dissolução das fases anidras (33, 34).

Apesar de favorecida, a precipitação dos hidratos envolve um processo lento de nucleação, durante o qual não ocorre precipitação. Este tempo de espera, necessário para que se atinjam condições ideais para a precipitação dos hidratos, é conhecido como período de indução. É um estado de equilíbrio metaestável, mantido até a barreira de energia de ativação (E_a), seja vencida para a formação dos primeiros núcleos de cristais dos hidratos, sendo tanto maior E_a quanto mais lenta for a velocidade para um determinado processo.

A nucleação é um fenômeno dinâmico, que pode ser descrito considerando-se que os íons Ca^{2+} e $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$, e as moléculas de água estão em constante movimento, chocando-se uns contra os outros, com uma frequência que aumenta com a temperatura e a concentração destas espécies. Assim, ligações entre as

espécies ocorrem aleatoriamente, sendo constantemente formadas e rompidas. Em algum momento, um conjunto de espécies pode permanecer unido por um tempo maior que o médio, permitindo, assim, o aumento de seu tamanho por meio dessa ligação com outras espécies. Ao se atingir um determinado tamanho crítico, verifica-se a formação de um núcleo estável.

A partir da formação dos primeiros núcleos estáveis, a velocidade de precipitação passa a não ser mais limitada por E_a , uma vez que, deste momento em diante, o processo deve ocorrer por meio do crescimento dos núcleos já formados. Desta maneira, estes núcleos crescem rapidamente, retirando os íons de Ca^{2+} e $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ da solução, e proporcionando a retomada da dissolução das partículas de cimento, o que possibilita um contínuo crescimento dos grãos de hidratos e consequente precipitação.

A principal fase encontrada no material endurecido é $3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (C_3AH_6), sendo a fase principal no sistema $\text{CaO}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{H}_2\text{O}$ que é termodinamicamente estável em condições ambientes (1).

3.3 Cimento de aluminato de cálcio (CAC) como biomaterial

O uso do CAC como biomaterial teve seu início na odontologia, quando Hermansson (35), em 1987, desenvolveu um processo químico com o objetivo de criar um novo restaurador dental, mais biocompatível do que a amálgama. No ano de 1990, foi depositada a primeira patente do CAC como um material restaurador da odontologia (35).

O CAC foi introduzido para aplicação clínica no ano 2000, quando lançou-se um produto comercial restaurador. O material é formado principalmente por aluminato de cálcio e também contém ZrO_2 e SiO_2 para modificar suas propriedades mecânicas. Estudo de toxicidade mostrou que esse produto exibiu a menor citotoxicidade comparado a outros materiais restauradores dentais. Estudo *in vivo* usando material restaurador a base de aluminato de cálcio mostrou que ocorreu ligação muito forte entre o material e os dentes com total preenchimento. Avaliou-se a propensão do material endurecido para formar hidroxiapatita em toda a sua superfície em uma solução fosfato. Quando imersa em solução PBS (solução

tampão fosfato-salino), uma camada espessa de hidroxiapatita foi precipitada na superfície do cimento (1).

Algumas características que indicam vantagens da aplicação do CAC como biomaterial são: a sua coloração branca, o desenvolvimento de pega úmida, não necessitando de campo seco para sua aplicação, baixa temperatura durante a pega e um tempo de reação que pode ser controlado pela adição de aditivos específicos.

Além disso, o desenvolvimento de composição do CAC para endodontia têm resultado em melhor fluidez, melhores condições de manuseio, maior resistência mecânica e reduzida porosidade, quando comparado ao MTA (agregado de trióxido mineral), material de destaque na odontologia e, particularmente, na endodontia (1).

Além dessas características físico-químicas, outros estudos também indicam seu potencial uso como biomaterial. De acordo com resultados preliminares, quando o CAC é exposto a células osteogênicas primárias, obtêm-se valores significativamente maiores da viabilidade celular e na atividade de fosfatase alcalina (36).

O CAC também pode ser indicado para uso na ortopedia, devido às suas características como alta viscosidade, permitindo injeção direta após a mistura, com pouca liberação de calor e boa biocompatibilidade (27, 37). Além disso, estudos têm reportado a aplicação do CAC na reparação de defeitos ósseos, devido à sua composição e seu coeficiente de expansão térmica ser bastante semelhantes ao dos dentes e ossos humanos (2, 3).

Estudos apontam o potencial uso do CAC, quando combinado com outros materiais, como óxido de zinco, resultando em melhores propriedades como biocompatibilidade e resistência mecânica (5).

Compósitos cerâmicos contendo zinco fornecem novas possibilidades na engenharia de tecido ósseo, visto que: (i) em compostos $Zn-Ca_3PO_4$, a presença de apatita acentuou a proliferação de células (38), e (ii) cerâmicas de aluminato contendo zinco apresentaram ação estimuladora sobre as células de osteoblastos e favorecem o processo de reabsorção (39).

Entretanto, estudo recente (5) apontou que, embora a composição CACH-ZnO (4%-p) tenha apresentado resultados promissores como biomaterial, quando comparado a materiais comerciais usados na odontologia e ortopedia, o valor obtido de radiopacidade ainda não foi suficiente para propósitos clínicos.

3.4 Radiopacidade

A radiopacidade é um pré-requisito imprescindível para materiais empregados como base e forramento de restaurações dentais. Em tais aplicações, o material deve ser suficientemente radiopaco, para que seja possível localizá-lo em uma radiografia e assim, delimitar a interface entre o dente e a restauração, e, principalmente, diferenciá-lo nitidamente da estrutura dental.

Trata-se de uma propriedade física essencial para todos os biomateriais, é importante para os materiais dentários e desejáveis aos agentes adesivos, especialmente para os materiais obturadores ou retroobturadores. Os agentes cimentadores são materiais utilizados para cimentação e selamento de restaurações e próteses dentárias (40). Uma vez que a radiopacidade permite a distinção de estruturas anatômicas adjacentes tais como osso e dentes (11, 41), é possível detectar cáries, defeitos em restaurações e fendas interfaciais (9). A maioria dos materiais usados em endodontia contém agentes radiopacos, visando uma melhor observação radiográfica do preenchimento do canal, e para checar a evolução do tratamento com o tempo (42).

Normalmente, a baixa radiopacidade dos biomateriais faz com que possam ser confundidos com tecido cariado ou espaços vazios (43). Também em tratamentos envolvendo a injeção de cimentos em fraturas de compressão vertebral, alta radiopacidade é necessária para verificar o local de implantação, evitando vazamentos na coluna vertebral ou veias.

De acordo com o protocolo de radiopacidade de materiais dentários, publicado pela *International Standards Organization* (ISO 4049), estes materiais devem ser mais radiopacos do que a dentina. Para isso, Beyer-Olsen e Ortavik (44) apresentaram um método para estabelecer um sistema padrão de mensuração da radiopacidade de vários cimentos endodônticos. As amostras são radiografadas ao lado de um aparato, em degraus, de alumínio, onde cada degrau apresenta uma espessura conhecida. O alumínio é o material de referência para comparação por possuir radiopacidade similar à da dentina (9).

As imagens obtidas são colocadas em um fotodensitômetro, e a densidade óptica de cada degrau é medida, correlacionando com as densidades dos cimentos, que devem ser medidas simultaneamente (44, 45).

A radiopacidade de um material pode ser aumentada pela adição de partículas que contenham metais pesados, tais como o bismuto ($Z = 83$), bário ($Z = 56$), zircônio ($Z = 40$), estrôncio ($Z = 38$) ou zinco ($Z = 30$). De fato, estudos têm mostrado superior radiopacidade do CAC, alcançando valores adequados quando combinado com Bi_2O_3 (45) ou a mistura ZnOBi_2O_3 , preservando suas propriedades mecânicas (13). O Bi_2O_3 apresenta um efeito pronunciado como radiopaco uma vez que quanto mais alto o número atômico do elemento presente na composição do material, mais radiopaco ele se apresenta (41).

Além disso, McLean e Gasser incluíram partículas de prata ao pó do ionômero de vidro, desenvolvendo um material radiopaco, que facilita o acompanhamento radiográfico do preenchimento da cavidade (14, 46).

Autores (14) avaliaram a influência de agentes radiopacos (sulfato de bário, óxido de titânio, óxido de zinco, ouro em pó e liga de prata/estanho em pó) para proporcionar uma radiopacidade satisfatória ao cimento à base de silicato de cálcio. A radiopacidade foi avaliada segundo a norma ISO 6876:2001 e diferentes teores (10, 15, 20, 25 e 30%) dos agentes radiopacos foram adicionados ao cimento. Os resultados mostraram que a liga de prata/estanho e o ouro em pó apresentaram uma radiopacidade maior que 3 mm de Al (recomendado pela ISO 6876:2001) com menor concentração comparada aos demais aditivos (47).

Por outro lado, estudos tem mostrado que a presença de aditivos radiopacos podem alterar outras importantes propriedades desejáveis para biomateriais. Algumas investigações relatam, por exemplo, que a presença de Bi_2O_3 induz o aumento da porosidade e reduz a resistência mecânica dos materiais reparadores (13, 14). Dessa forma, a investigação do efeito desses aditivos sobre outras propriedades se faz necessária para uma adequada seleção da composição de um biomaterial.

3.5 Outras propriedades desejáveis para biomateriais

Os biomateriais devem também apresentar ainda outras propriedades que influenciam sua aplicação:

- Propriedades mecânicas: possuir resistência mecânica adequada para suportar tensões existentes no ambiente onde é implantado (17, 48). Para utilização

como biomaterial, destaca-se a necessidade do material apresentar adequada resistência mecânica. Cimentos aluminosos vêm sendo utilizados na odontologia e reparação de defeitos ósseos, pois sua principal vantagem é a alta resistência mecânica à compressão (1). Além disso, uma maior resistência do CAC pode ainda ser obtida por incorporação de aditivos com partículas finas e materiais óxidos (1, 24). A concentração localizada de tensões pode ser o sítio inicial de falhas do biomaterial. A microfratura pode levar à microinfiltração, ingresso de bactérias, bem como ao deslocamento do biomaterial (21);

- Porosidade: tamanho e morfologia dos poros são fatores com grande importância no transporte de nutrientes para células transplantadas e regeneradas. A obtenção de uma microestrutura do material com baixa porosidade e ausência de canais capilares fornece melhor proteção contra a microinfiltração e superior resistência mecânica. O cimento deve apresentar uma adequada capacidade seladora a fim de evitar uma infecção por invasão de bactéria e subseqüentes cirurgias de revisão;
- Bioatividade: a determinação da bioatividade *in vitro* de um material é o primeiro passo na determinação da bioatividade *in vivo*, isto é, quando implantado no corpo (49). Um material bioativo é definido como aquele que promove uma resposta específica na interface do material, que resulte na formação de uma ligação entre o tecido e o material (50). Estes materiais apresentam a capacidade de criar uma ligação química interfacial com o tecido vivo, tão forte ou mais forte do que o osso (49). A bioatividade de cerâmica é governado pela reação entre a cerâmica e o fluido corporal. Cerâmicas bioativas formam uma camada de apatita biologicamente ativa similar ao osso, após ter sido implantado no defeito ósseo. É, portanto, uma condição importante para materiais cerâmicos formar uma camada de apatita sobre suas superfícies após exposição ao ambiente do corpo expressando a propriedade de estabelecer uma ligação direta com o osso vivo (51). Um método comum que tem sido usado para o teste de bioatividade *in vitro* é avaliar a capacidade de formação de apatita em uma solução simuladora de fluido corporal (SBF) (52, 53). O exame da formação de apatita na superfície de um material em SBF

é útil para prever a bioatividade *in vivo* do material. Além disso, ele pode reduzir ambos, o número de animais utilizados e o tempo de duração dos testes, acelerando o desenvolvimento de novos tipos de materiais bioativos (53). Assim, cáries secundárias, principalmente formadas devido ao espaço entre o material reparador e os dentes (o qual permite a entrada de bactérias), podem ser evitadas, assim como a necessidade de substituir a restauração;

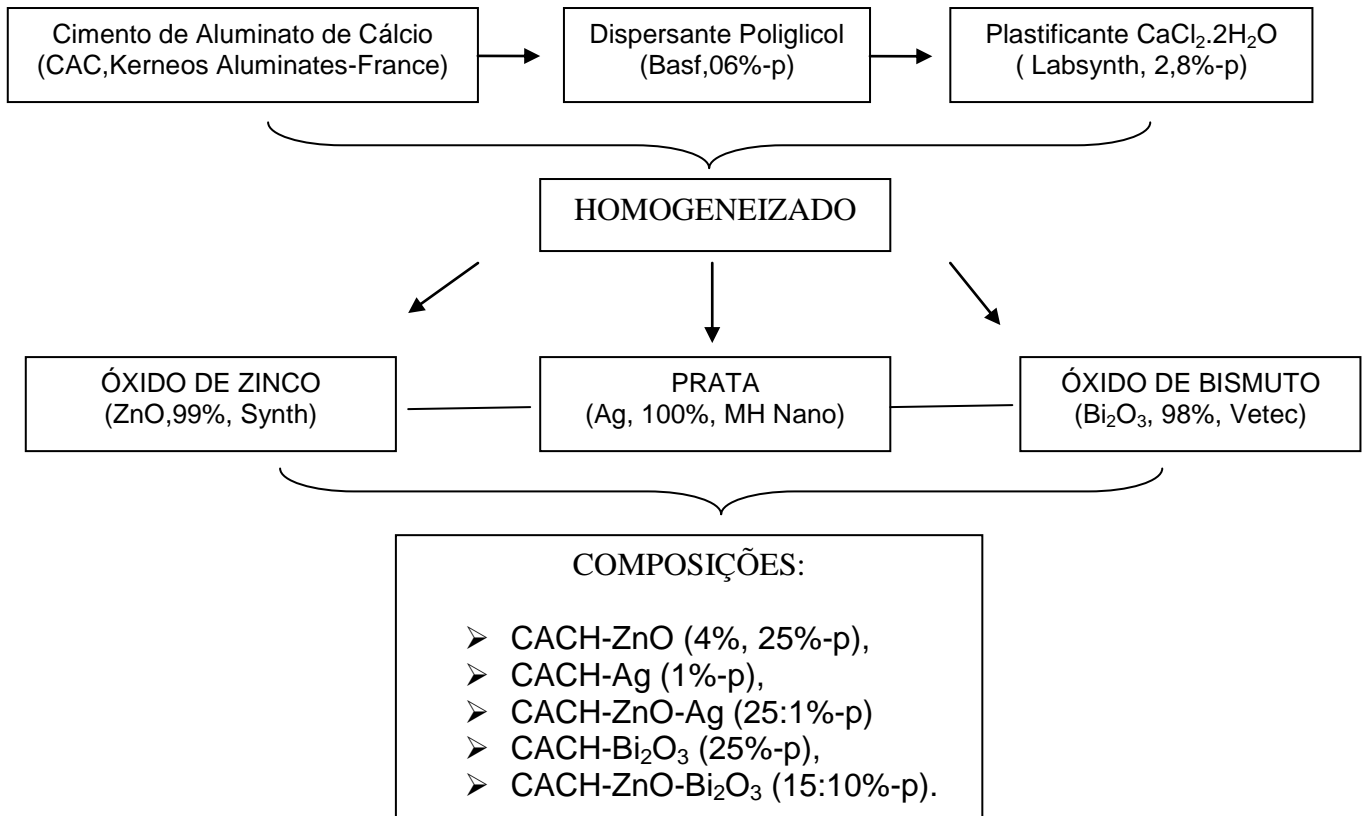
- Viabilidade celular: a capacidade de estimular uma resposta das células também é muito importante e complementa os dados de deposição de apatita *in vitro*. Ensaios realizados *in vitro* permitem determinar os efeitos da exposição às composições à base de CAC sobre importantes parâmetros da progressão de culturas de células osteogênicas e avaliar o desenvolvimento do fenótipo osteogênico em culturas de células osteoblásticas expostas por diferentes períodos às composições. Resultados preliminares *in vitro* avaliaram a viabilidade de células osteoblásticas quando em contato com composições de CAC apontando resultados promissores principalmente para as amostras contendo zircônia, colágeno e óxido de zinco. Estudos com composição a base de CAC contendo 10%-p CaCl_2 apoiaram a aquisição do fenótipo de células osteogênicas *in vitro*, tornando este novo material uma alternativa potencial em procedimentos endodônticos. Entretanto, estudos *in vivo* são necessários para verificar se o efeito benéfico *in vitro* do CAC+ em células osteoblásticas correspondem a um aumento e/ou aceleração da reparação óssea na região periapical (54);
- Capacidade bacteriostática: é um grande atrativo para biomateriais, uma vez que a questão mais importante relacionada aos dispositivos artificiais é a infecção por fungos e bactérias. Biomateriais são facilmente colonizados por microrganismos como a *S. aureus* e *E. coli*, após a sua implantação. O tipo de material utilizado na sua fabricação pode diferenciar em relação à propensão de adesão bacteriana (55), podendo até inibir a formação do crescimento bacteriano. A infecção por bactéria começa com a sua adesão, seguida pela colonização. Por isso, é importante inibir a adesão de bactérias na superfície dos implantes, produzindo-os com funções antibactericidas (56). O CAC mostrou resultados positivos contra *S. aureus*, após 24 horas de avaliação,

semelhante ao MTA (57). Em ambos os estudos, o efeito positivo dos materiais foi correlacionado aos altos valores de pH proporcionados pelos materiais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados neste trabalho estão apresentados na Figura 3 em forma de fluxograma, mostrando a sequencia de misturas realizadas.

Figura 3: Fluxograma de preparação das composições estudadas



Fonte: Autor.

O cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CACH) foi produzido pela mistura em moinho de bolas, a seco durante uma hora, de CAC com o dispersante e o plastificante. Inicialmente, os aditivos radiopacos (ZnO, Ag e Bi₂O₃) foram caracterizados quanto a distribuição de tamanho de partículas utilizando o equipamento (S3550, Microtrac), após desaglomeração via ultrassom, durante 15 minutos (Sonics Vibra-cell, modelo VCX 500).

Os aditivos radiopacos foram adicionados ao CACH, seguido de homogeneização durante 1 hora em moinho de bolas, resultando nas composições conforme a Figura 3. Em seguida, foram preparadas suspensões aquosas (80%-p de sólidos), com auxílio de agitador mecânico (MA1039, Marconi), a partir das quais

foram moldadas amostras para caracterização. As amostras para caracterização mecânica foram moldadas em corpos cilíndricos (16 mm de diâmetro x 18 mm de altura). E as amostras de radiopacidade foram moldadas em pastilhas de (10 mm de diâmetro x 1 mm de espessura). As amostras, após a moldagem, foram mantidas a 37 °C em uma estufa (MA 830/A, Marconi) em ambiente saturado durante 24 horas (cura).

As propriedades avaliadas foram radiopacidade, resistência mecânica, porosidade aparente, distribuição de tamanho de poros, bioatividade, viabilidade celular e bacteriana.

4.1 Radiopacidade

Após a cura, amostras (10 mm de diâmetro x 1 mm de espessura) em quadruplicata foram desmoldadas e secas em estufa a 37 °C durante 24 horas.

Os ensaios de radiopacidade consistiram em colocar as amostras sobre um filme oclusal (IO-41, Insight Carestream dental, Kodak). Ainda sobre esse mesmo filme, colocou-se uma escada de alumínio 99 % (liga 1100), cuja espessura varia de 1 a 10 mm, aumentando em incrementos uniformes de 1 mm por degrau com o objetivo de permitir a comparação entre os degraus da escada e as respectivas amostras. Para analisar a radiopacidade utilizou-se o aparelho de Raios X (Procion, ION 70X) que foi regulado para emitir radiação com 70 KVp e 8 mA. À distância foco-objeto, que o separa das amostras foi de 20 cm, sendo o tempo de exposição de 0,32 segundos. Depois de radiografados, os filmes foram revelados manualmente em uma câmara escura de acordo com a relação tempo/temperatura recomendada pelo fabricante (Kodak). Dessa forma, o esquema de revelação seguiu a sequência: durante 3 minutos na solução reveladora, lavada em água por 30 s, fixada durante 3 minutos em uma solução fixadora e posteriormente lavadas em água durante 10 minutos e secas com auxílio de secador. Obtendo-se a radiografia, procedeu-se então a leitura das medidas de densidade óptica (D_O) das amostras e de cada degrau da escada de alumínio, com a ajuda de um fotodensitômetro (MRA, Indústria de Equipamentos Eletrônicos Ltda). Os resultados de densidade óptica representam a média de quatro medidas para cada amostra e foram submetidos a uma regressão polinomial para obter o valor equivalente em radiopacidade (mm Al).

4.2 Ensaio mecânico e porosidade aparente

Após a cura, amostras (16 mm de diâmetro x 18 mm de altura) foram desmoldadas e imersas em solução de fluido corporal (SBF) (58) e retornadas para a estufa a 37 °C. Após sete dias, amostras úmidas foram submetidas a ensaios de resistência à compressão uniaxial, enquanto outras secas a 110 °C em estufa (MA 033, Marconi) durante 24 horas e submetidas a medidas de porosidade aparente pelo método de Arquimedes. Medidas de porosidade aparente também foram realizadas para as amostras secas a 110 °C sem tratamento em SBF.

A solução SBF foi preparada como apresentado na Tabela 1, utilizando-se uma quantidade dos reagentes em uma proporção 1,5 vezes superior (SBF 1,5) a concentração de íons (mol. L^{-1}) inorgânicos presentes no plasma humano a fim de acelerar a formação de apatita.

Tabela 1: Reagentes usados na preparação de um litro de SBF

Reagente	SBF 1,5
Água	400 mL
NaCl	11,992 g
NaHCO ₃	0,529 g
KCl	0,335 g
K ₂ HPO ₄	0,261 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,458 g
HCl 0.1MOL/L	15 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,551 g
Na ₂ SO ₄	0,107 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ 0.05MOL/L	Teor necessário para ajuste pH= 7,25
HCl 0.1MOL/L	Teor necessário para ajuste pH= 7,25

Fonte: (autor)

A resistência à compressão uniaxial foi medida a uma velocidade de deslocamento de 0,15 mm/min (ASTM C67) para pelo menos cinco amostras de cada composição usando uma máquina de ensaios mecânicos (DL 10000, EMIC). A

tensão de ruptura σ_R (MPa) foi calculada. Descrita por meio da seguinte equação química (Equação 4).

$$\sigma_R = \frac{4 \cdot P}{\pi \cdot D^2} \quad (4)$$

onde, P (N) é a carga máxima requerida para fraturar cada amostra e D (mm) é o diâmetro médio das amostras.

A porosidade aparente (PA) pelo método de Arquimedes (ASTM C830) foi medida usando amostras em triplicata as quais foram inicialmente pesadas a seco (M_s) e após 1 hora de imersão em querosene ($\rho = 0,8 \text{ g/cm}^3$) sob vácuo, foram novamente pesadas quando imersas no líquido (M_i) e úmidas (M_u). Assim, a porosidade aparente foi calculada pela massa de líquido retida em seus poros abertos como apresentado pela equação (Equação 5).

$$PA = 100\% \times \frac{(M_u - M_s)}{(M_u - M_i)} \quad (5)$$

4.3 Distribuição de tamanho de poros

Amostras cilíndricas (16 mm de diâmetro x 18 mm de altura) secas a 110 °C durante 48 horas que foram tratadas ou não em SBF também foram submetidas a ensaios de distribuição de tamanho de poros.

A distribuição de tamanho de poros por meio da técnica de porosimetria de intrusão de mercúrio foi realizada utilizando o equipamento (Autopore IV 9500, Micromeritics). A técnica é baseada na equação de Washburn onde D é o diâmetro do poro, P é a pressão aplicada, γ é a tensão superficial do mercúrio e ϕ é o ângulo de contato (130°) entre o mercúrio e a amostra. O volume de mercúrio (V) que penetra os poros é medido diretamente em função da pressão aplicada (P).

Descrita por meio da seguinte equação (Equação 6).

$$D = 4 \cdot \frac{\gamma}{P} \cdot \cos(\varphi) \quad (6)$$

4.4 Bioatividade

Após a cura, amostras (11 mm x 4 mm) em duplicata foram desmoldadas e mantidas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Em seguida, foram adicionadas a frascos de polipropileno (60 mL) contendo 33 ml de SBF e armazenadas em estufa a 37°C. Medidas de pH e concentração de íons Ca^{2+} foram realizadas para as amostras em função do tempo (até 21 dias). Foram utilizados um equipamento medidor de pH (MA 522/E, Marconi) e um medidor multiparâmetros com eletrodo seletivo para íons Ca^{2+} (série 930, Aprolab). Esses ensaios foram repetidos usando amostras previamente tratadas em 33 mL de solução de silicato de sódio (SS, $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$, Dinâmica) à 37 °C, por 7 dias.

Amostras (10 mm x 1 mm) sem e com tratamento prévio com solução de silicato de sódio (SS) foram adicionadas a frascos de polipropileno (60 mL) contendo 19 mL de SBF mantendo-se uma razão área superficial/volume de $0,1 \text{ cm}^{-1}$, durante 21 dias sob agitação a 37 °C usando um *shaker* (MA420, Marconi). Após esse período, as amostras foram levemente lavadas com água para remover a solução e posteriormente secas à temperatura ambiente. A superfície das amostras foi caracterizada usando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV, EVOMA10, Zeiss), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e espectroscopia raman. Para análises de espectroscopia raman foi utilizando o sistema confocal da Rivers Diagnostics (Model 3510) acoplada a um laser com comprimento de onda igual a 785 nm. O sinal Raman foi coletado por um CCD (*Charge Coupled Device*) e registrado em um computador acoplado ao sistema. Os parâmetros de medidas dos dados espectrais foram definidos utilizando *software Rivers*. A potência nas amostras foi de aproximadamente 25 mW. Analisou-se a impressão digital espectral ($800\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$) com tempo de exposição de cinco segundos e três acumulações. Os espectros foram obtidos com o foco apenas na superfície das amostras.

4.5 Viabilidade celular

Amostras (6 mm de diâmetro x 2 mm de espessura) foram moldadas em ambiente estéril (fluxo laminar VECO) e curada em estufa a 37 °C durante 24 horas em ambiente saturado. Após a cura as amostras foram esterilizadas a seco em estufa a 110 °C por 24 horas, seguido de tratamento em fluxo (UV) durante 20 minutos.

A linhagem celular usada foi osteoblastos humanos (ATCC-HTB-85 da linhagem SAOS-2). As células foram cultivadas em garrafas de cultura (75 cm³, Corning Inc.) contendo 10 mL de meio de cultura McCoy's 5A (Sigma), 15% de soro fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL penicilina (Gibco).

A cultura celular ($2,0 \times 10^4$ células/poço) foi adicionada a placa de 24 poços e cultivadas em meio osteogênico suplementado com 7 mol.L^{-1} de β -glicerofosfato (Sigma) e 50 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma) a qual foi mantida a 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5 % de CO₂ e 95 % de ar atmosférico e o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias.

As culturas foram deixadas aderir por 24 horas e expostas às amostras posicionadas sobre insertos e por período de até sete dias. Como controles foram utilizadas culturas expostas à meio de cultura contendo dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (negativo) e culturas crescidas apenas na presença do meio (positivo).

Após 24 horas, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT (Sigma). Alíquotas de MTT (5 mg/mL) em PBS (Gibco) foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas com esta solução a 10 % em meio de cultura, por 4 horas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂ e 95 % de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1 mL de PBS aquecido. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol e 134 µL de HCl) em cada poço sob agitação por 5 min, para a solubilização completa do precipitado formado. Foi realizada a medida colorimétrica em espectrofotômetro (570 nm; µQuant, BioTek Instruments).

No ensaio de MTT, a citotoxicidade celular é avaliada através da atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais. Estas enzimas têm a capacidade de clivar o anel tetrazólio do corante utilizado, formando um cristal insolúvel de formazan de cor roxa. Após a solubilização, obtém-se uma solução cuja absorvância

pode ser medida, sendo que a intensidade da cor mensurada será diretamente proporcional a quantidade de células viáveis.

O MTT é utilizado para mensurar a atividade mitocondrial de células vivas e representa um parâmetro de suas atividades metabólicas. Desta forma, pode ser avaliada a viabilidade ou crescimento celular.

Após 7 dias, foi realizado ensaio para visualização da atividade de fosfatase alcalina (ALP) *in situ*, por marcação pelo método *Fast red* (59). O meio de cultura foi removido e os poços, lavados com PBS (Gibco) aquecido a 37 °C. Foi adicionado 1 mL/poço de solução tampão Tris (Sigma) a 120 mol.L⁻¹ com pH 8,4, contendo 1,8 mol.L⁻¹ de *Fast red* TR (Sigma), 0,9 mol.L⁻¹ de naftol-ASMX-fosfato (Sigma) e 1:9 de dimetilformamida (Merck) e as placas foram mantidas por 30 min em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ e 95 % de ar atmosférico. Foram obtidas imagens macroscópicas das amostras para avaliação qualitativa da atividade de ALP.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente onde foram aplicados os testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste, quando apropriado. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

4.6 Viabilidade bacteriana

Amostras (6 mm de diâmetro x 2 mm de espessura) utilizadas no ensaio de viabilidade bacteriana foram preparadas seguindo o mesmo procedimento descrito na seção anterior.

Os microrganismos utilizados foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

O preparo das soluções bacterianas (*S.aureus* e *E.coli*) ocorreu por meio da adição de 7 µL de uma cultura estoque em 6 mL de caldo Luria Bertani (LB, Sigma) estéril e armazenados em tubos de vidro 18x18 mm (Pyrex®). As soluções bacterianas foram incubadas em estufa (Fanem®) a 37 °C durante 3 horas.

O preparo do caldo LB (100 mL) ocorreu pela adição de 3,7 gramas do meio em 100 mL de água destilada seguido de agitação usando agitador magnético até

que formasse uma mistura homogênea. Posteriormente, a solução foi autoclavada (Fanem[®]) em uma temperatura de 121 °C por 15 minutos para esterilização e estocada em um Erlenmeyer a 37 °C.

As soluções bacterianas foram diluídas a fim de se obter $1,0 \times 10^5$ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Uma alíquota de 5 µl das soluções diluídas foram adicionadas a 200 µL de meio LB em uma placa de 96 poços. Em seguida as amostras foram colocadas nos poços em triplicata, seguido de incubação pelo período de 24 h a 37 °C. Como controles foram utilizados poços contendo meio mais solução bacteriana (positivo) ou apenas meio LB (negativo). Após o período de incubação uma alíquota de 150 µL do sobrenadante de cada poço foi retirada e levada para leitura de densidade óptica das amostras (DO) utilizando o espectrofotômetro SpectraCount[®] (Packard) com um filtro de 570 nm.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, aplicando-se a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste, quando apropriado. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

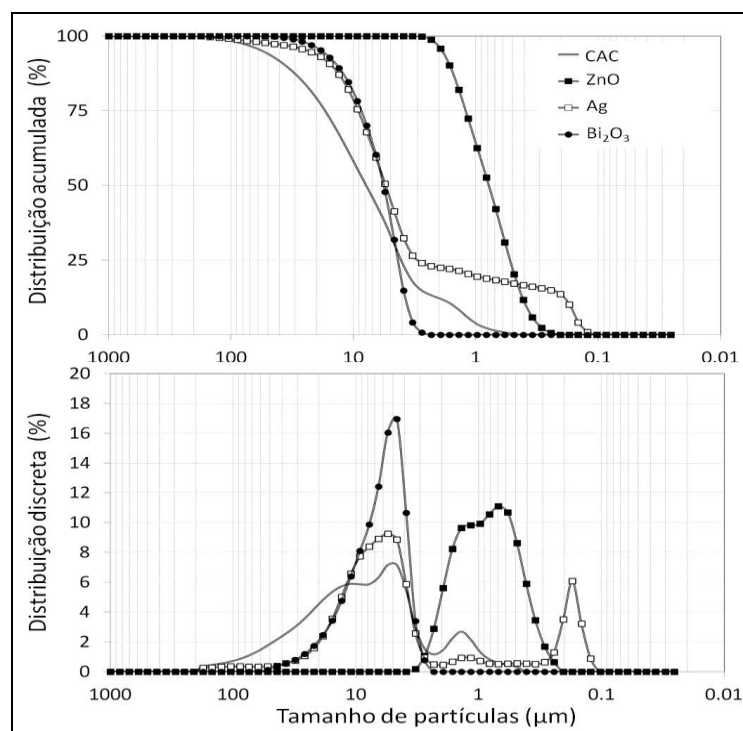
As amostras após interação com as soluções bacterianas foram retiradas dos poços e fixadas em uma solução contendo paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e PBS por 2 horas e lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, as amostras foram desidratadas em solução crescente de acetona (50 - 70 - 90 - 100%) com intervalo de 10 minutos, sendo a última de 30 minutos. Posteriormente as amostras foram metalizadas (K550X, Emitech) para a observação por meio de MEV (EVOMA10, Zeiss).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de análise de distribuição de tamanho de partículas dos aditivos radiopacos, comparado ao CAC são apresentados na Figura 4. A partir da distribuição acumulada, observa-se que o óxido de zinco apresentou partículas significativamente menores ($D_{50} = 0,8 \mu\text{m}$) quando comparado à prata e ao Bi_2O_3 ($D_{50} \sim 5,5 \mu\text{m}$) e ao CAC ($D_{50} = 8,0 \mu\text{m}$).

A distribuição discreta revelou que, o CAC puro e a prata, apresentaram distribuição multimodal. O ZnO apresenta distribuição bimodal, enquanto o Bi_2O_3 apresenta distribuição monomodal.

Figura 4: Distribuição de tamanho de partículas dos aditivos radiopacos: ZnO, Ag e Bi_2O_3 , comparado ao CAC.



5.1 Radiopacidade

A radiopacidade para cada composição avaliada, expressa em espessura equivalente de alumínio (mm Al), é apresentada na Figura 5. Como esperado, um

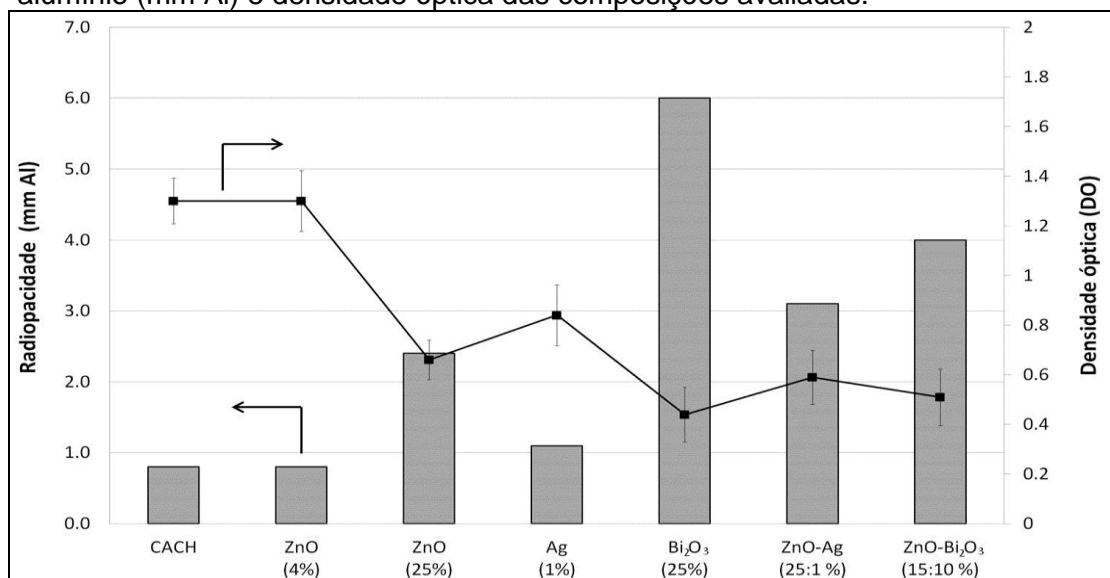
decréscimo da densidade óptica (DO) é observado com o aumento da radiopacidade (12).

Os resultados confirmam que a radiopacidade aumenta com o número atômico (Z) do elemento incorporado, uma vez que aumenta sua capacidade de absorção de raios X (43). O bismuto apresenta $Z_{Bi}=83$, superior ao da prata ($Z_{Ag}=47$) e zinco ($Z_{Zn}=30$), o que justifica a elevada radiopacidade da composição CACH-Bi₂O₃ (25%-p). As composições com ZnO não apresentaram altos valores mesmo na presença de 25%-p, assim como a composição contendo 1%-p de Ag.

Por outro lado, a composição contendo ZnO-Bi₂O₃ (15:10 %-p) apresentou adequado valores de radiopacidade superior ao mínimo exigido pela norma (> 3 mmAl) e a composição ZnO-Ag (25:1 %-p) apresentou radiopacidade mínima (3 mmAl) para propósitos clínicos, estando de acordo com a norma ISO 6876:2012 (8, 60).

Outra vantagem da combinação entre os aditivos radiopacos deve-se ao fato que, quando adicionado Bi₂O₃ em altos teores, a resistência mecânica do biomaterial é muito prejudicada (13).

Figura 5: Valores médios de radiopacidade, expressos em espessura equivalente de alumínio (mm Al) e densidade óptica das composições avaliadas.

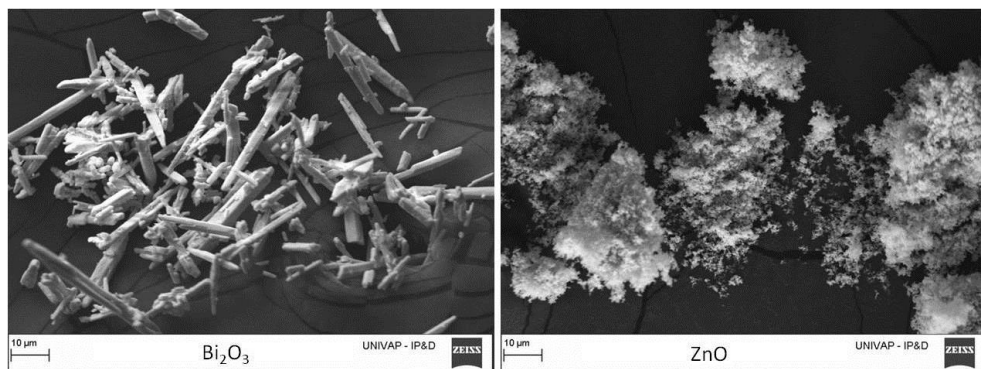


Fonte: Autor.

5.2 Resistência mecânica e porosidade aparente

Os resultados de resistência mecânica, após contato das amostras com SBF, por sete dias são apresentados na Figura 6. Observa-se que a adição, principalmente de Bi_2O_3 , diminuiu a resistência à compressão uniaxial, quando comparado ao composto contendo 25%-p de ZnO. Este resultado é corroborado por outros autores (13). Os resultados de distribuição de tamanho de partículas mostrou que a prata e o Bi_2O_3 apresentam diâmetro médio de partículas muito próximo ($D_{50} \sim 5,5 \mu\text{m}$). A menor resistência mecânica foi a do Bi_2O_3 , como apresentado na Figura 7, que é explicado pela alta porosidade decorrente de suas partículas as quais possuem formato acicular (13).

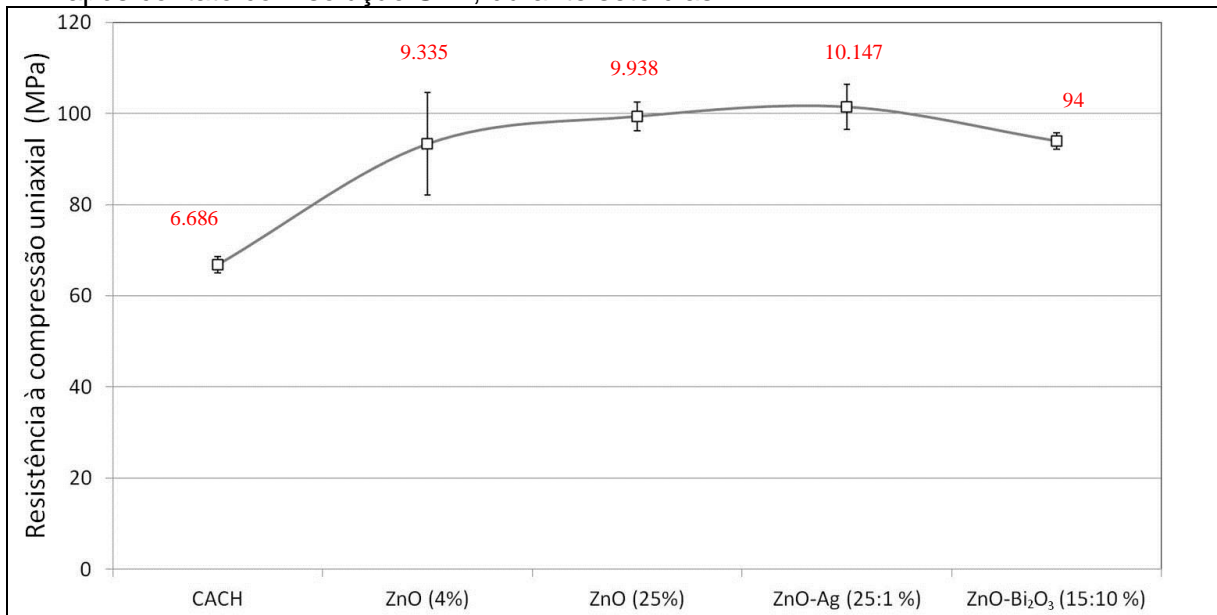
Figura 6: Tamanho de grãos Óxido de Bismuto (Bi_2O_3) e Óxido de zinco(ZnO)



Fonte: adaptado (13).

Cabe ressaltar, que os valores de resistência mecânica obtidos ainda se mostram comparáveis, ou seja, estão na mesma ordem de grandeza do obtido pela composição contendo 4%-p de ZnO, com a vantagem de apresentar superior e adequada radiopacidade.

Figura 7: Resistência mecânica à compressão uniaxial das composições avaliadas, após contato com solução SBF, durante sete dias.



Fonte: Autor.

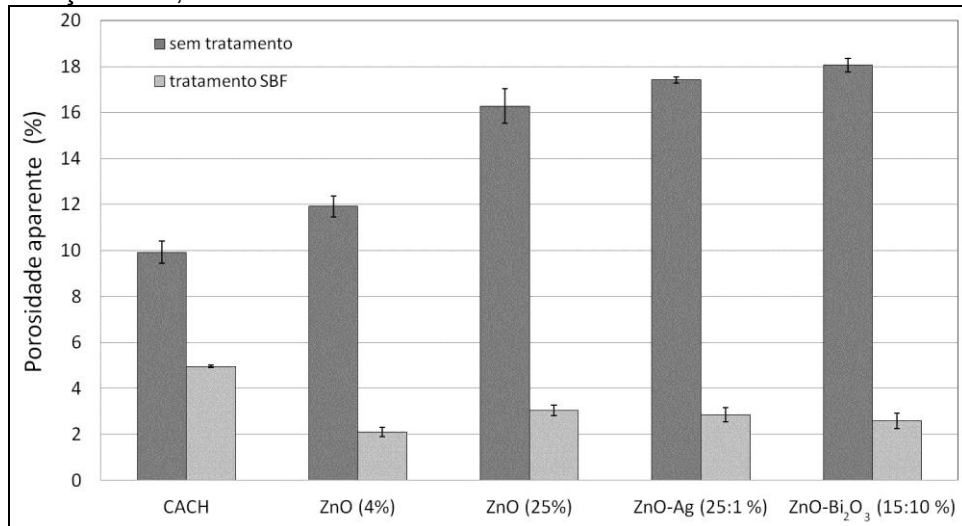
A medida da resistência mecânica à compressão é importante quando avaliada a aplicação ortopédica, onde o biomaterial deve apresentar alta resistência à compressão visto que a vértebra é sujeita principalmente a tais esforços, evitando assim fraturas do cimento endurecido e garantindo a rápida mobilização do paciente (37). Também na odontologia, a resistência à compressão é um fator importante a ser considerado quando o material de preenchimento é colocado na cavidade que irá sofrer pressão oclusal (tal como preenchimento do canal) ou até mesmo como base restauradora (13).

As propriedades mecânicas do tecido ósseo podem ser divididas em intrínsecas e extrínsecas, respectivamente, que se refere ao comportamento do material somente a nível tecidual ou ao osso como um todo, refletindo em seus valores os efeitos combinados do tamanho, da forma e das características teciduais (61).

Os resultados de porosidade aparente, antes e após contato das amostras com SBF, por sete dias, são apresentados na Figura 8. A adição dos radiopacos aumentou a porosidade das amostras sem tratamento, pois a presença dos elementos radiopacos afastam os grãos do CACH. Após contato com SBF, a porosidade diminuiu significativamente para todas as amostras, possivelmente

devido a precipitação de apatitas na superfície do material preenchendo seus poros. Com os radiopacos, mantiveram-se na faixa de 2 a 3%.

Figura 8: Porosidade aparente das composições avaliadas, antes e após tratamento com solução SBF, durante sete dias.

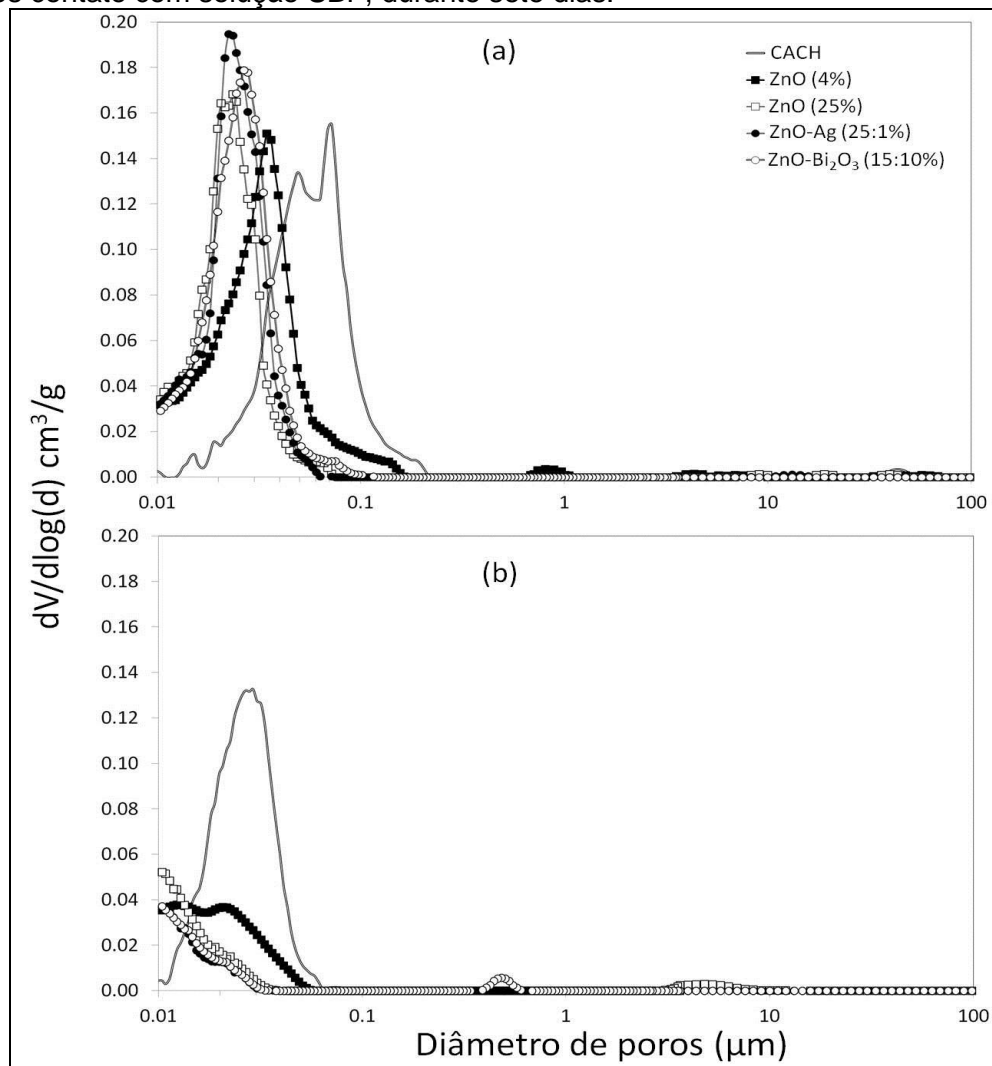


Fonte: Autor.

5.3 Distribuição de tamanho de poros

Na Figura 9, são apresentados os resultados de distribuição de tamanho de poros obtidos para as diferentes composições, antes (Figura 8a) ou após (Figura 8b) tratamento com SBF, durante sete dias. Observa-se que quando adicionados os aditivos radiopacos ocorreu redução no tamanho dos poros em relação ao CACH. Entretanto, após o tratamento com SBF, a porosidade e tamanho dos poros das composições contendo radiopacos foram significativamente reduzidos, pois a deposição de HA na superfície da amostra cria sítios que favorecem a osteointegração aumentando a biocompatibilidade desta cerâmica, concordando com os resultados de porosidade aparente. Isso indica que as composições contendo radiopacos podem ter sua resistência mecânica melhorada quando aplicadas *in vivo*.

Figura 9: Distribuição de tamanho de poros das composições avaliadas (a) antes e (b) após contato com solução SBF, durante sete dias.



Fonte: Autor.

O comportamento observado pode ser associado à precipitação de apatitas (fosfato de cálcio) na superfície das amostras quando em contato com solução SBF indicando a bioatividade das composições estudadas (6).

Os fosfatos precipitados (derivados das interações da superfície das amostras com compostos presentes no SBF) podem recobrir a superfície das amostras e preencher os poros. Conseqüentemente, o tamanho médio dos poros é significativamente reduzido quando comparado às amostras sem tratamento.

A fim de verificar tal comportamento, a bioatividade das composições foi avaliada, como apresentado a seguir.

5.4 Bioatividade

De acordo com a literatura, quando em contato com soluções contendo fosfato como o SBF, materiais bioativos apresentam a habilidade em formar apatita (fosfato de cálcio) na sua superfície (52, 58, 62) Materiais com essa camada de apatita desenvolvem ligação química e integração biológica com o osso (18).

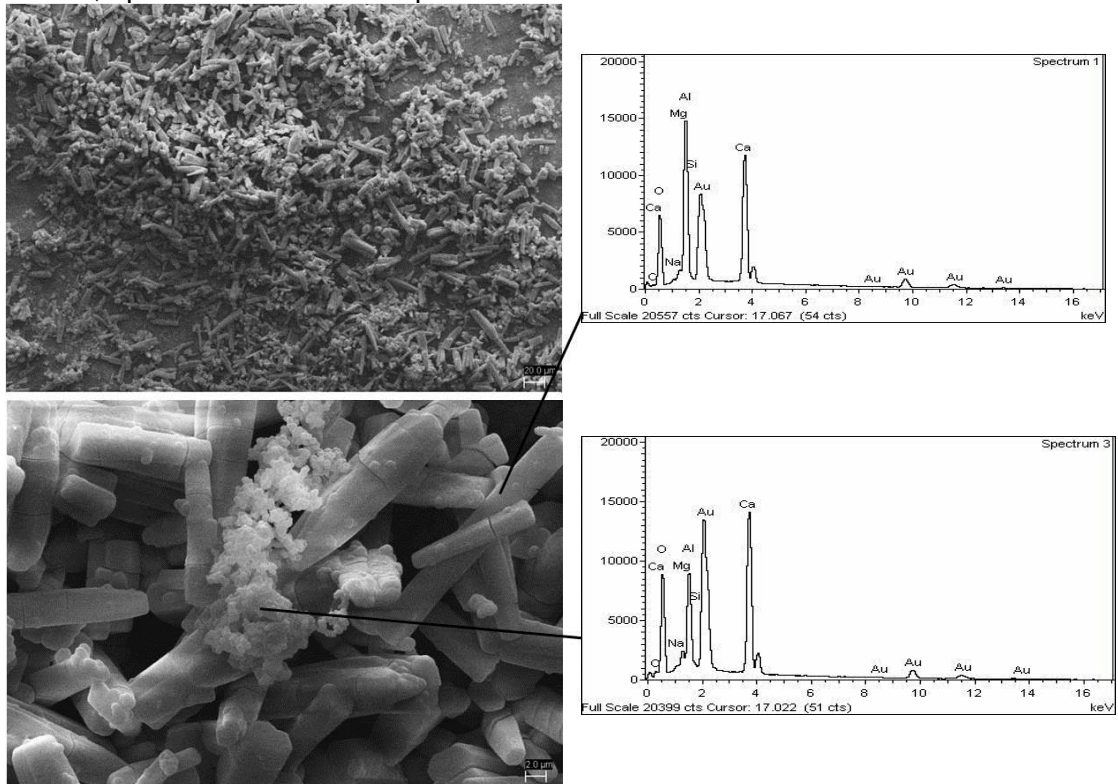
Hench definiu bioatividade como a capacidade de um material em formar, na sua superfície, uma camada de hidroxiapatita carbonatada, que promova uma interface de ligação forte com os tecidos vivos (18). A fase de hidroxiapatita carbonatada que se forma na superfície do material bioativo é química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso. É esta equivalência que é responsável pela ligação interfacial, permitindo uma ligação química ao osso (6).

SBF é uma solução metaestável e se torna termodinamicamente estável por meio da formação de precipitados incluindo diferentes fases de fosfato de cálcio, mas a hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$ é a fase mais estável termodinamicamente em solução SBF (63).

Os resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise por energia dispersiva de raios X (EDX), a fim de avaliar a interação das composições com SBF antes e após tratamento com silicato de sódio (SS), são apresentados nas Figuras 10-19. Pode ser observada a precipitação de fases na superfície das amostras em SBF antes e após tratamento com solução de silicato de sódio.

A identificação dos elementos cálcio e principalmente fósforo por EDS indica a formação de fases de fosfato de cálcio. Além desses elementos, também foi identificada a presença de alumínio, o principal constituinte das fases presentes no CAC como as fases CA e CA_2 formadas por CaO (C) e Al_2O_3 (A).

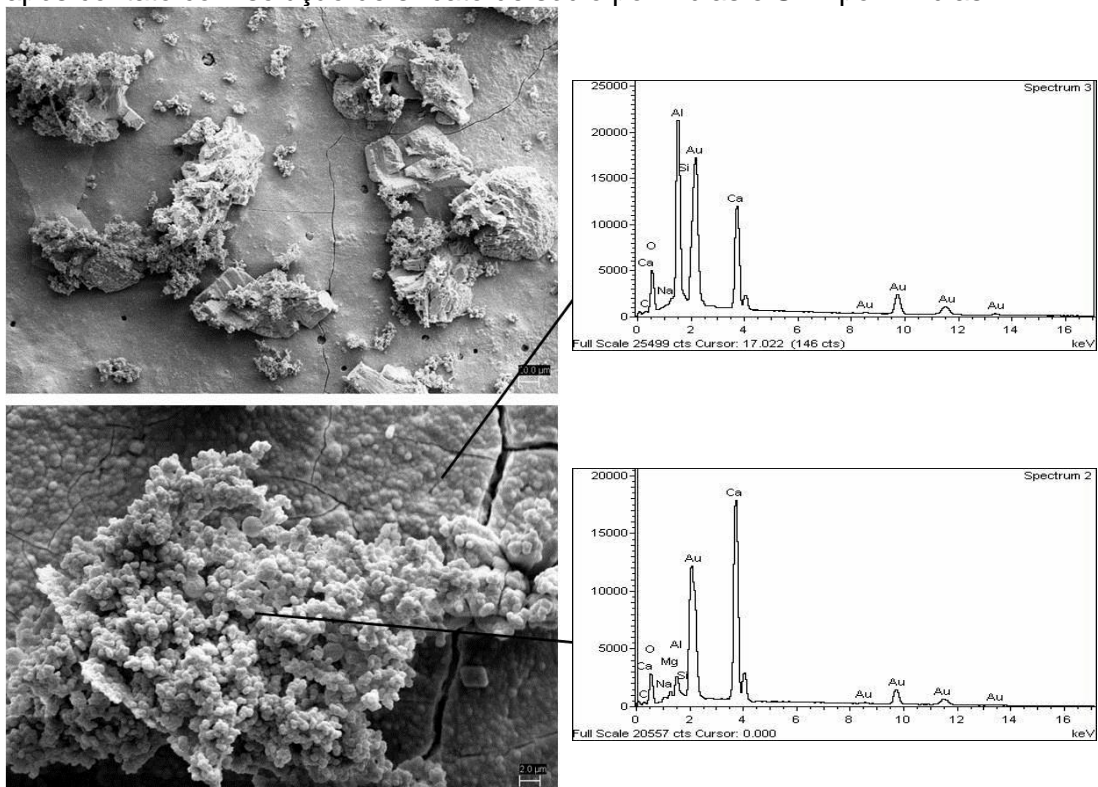
Figura 10: Micrografia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra CACH, após contato com SBF por 21 dias.



Fonte: Autor.

Na Figura 10 podemos observar que a composição CACH, após o contato com o SBF, favoreceu a precipitação de fosfatos, observados pelos picos de cálcio e fósforo que estão presentes no gráfico. Estes picos são característicos da formação de HA.

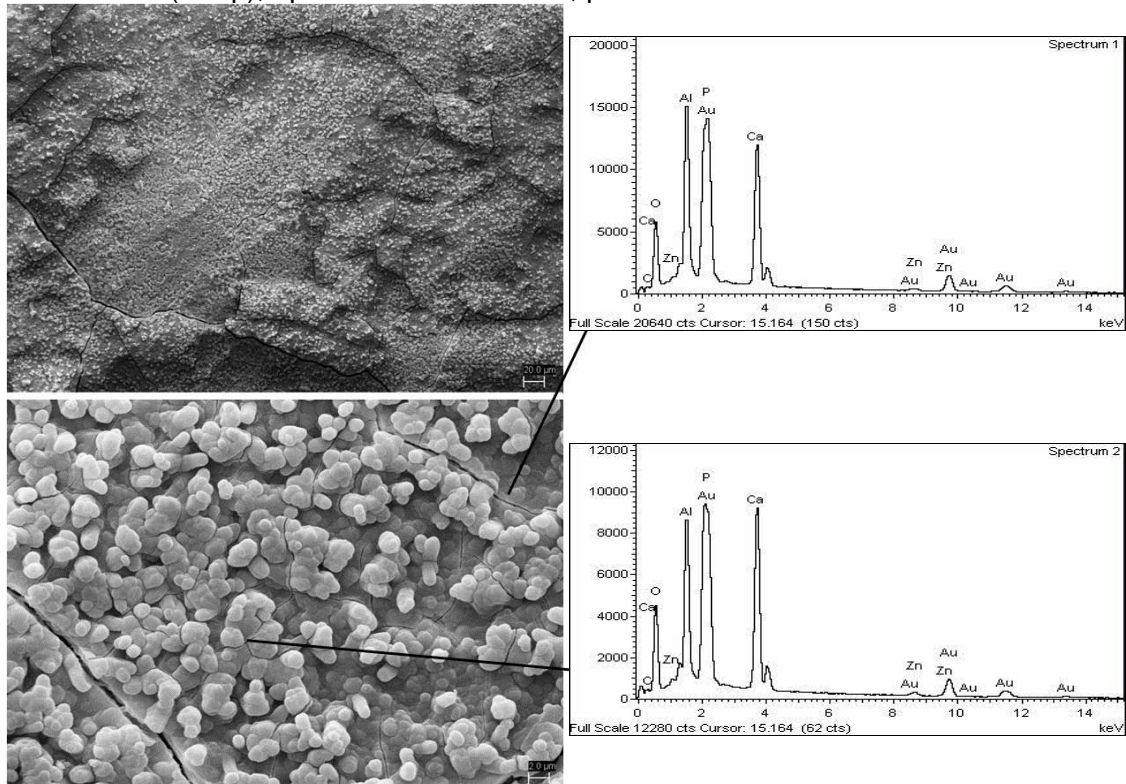
Figura 11: Micrografia eletrônica de varredura e espectro EDS para a amostra CACH após contato com solução de silicato de sódio por 7 dias e SBF por 21 dias.



Fonte: Autor.

Na Figura 11 podemos observar que a composição CACH, após o contato com o SBF/SS, favoreceu o recobrimento de fosfato de cálcio, usando um composto formado por CaO-SiO_2 que foi colocado em contato com um substrato para induzir a nucleação de apatita sobre ele em SBF.

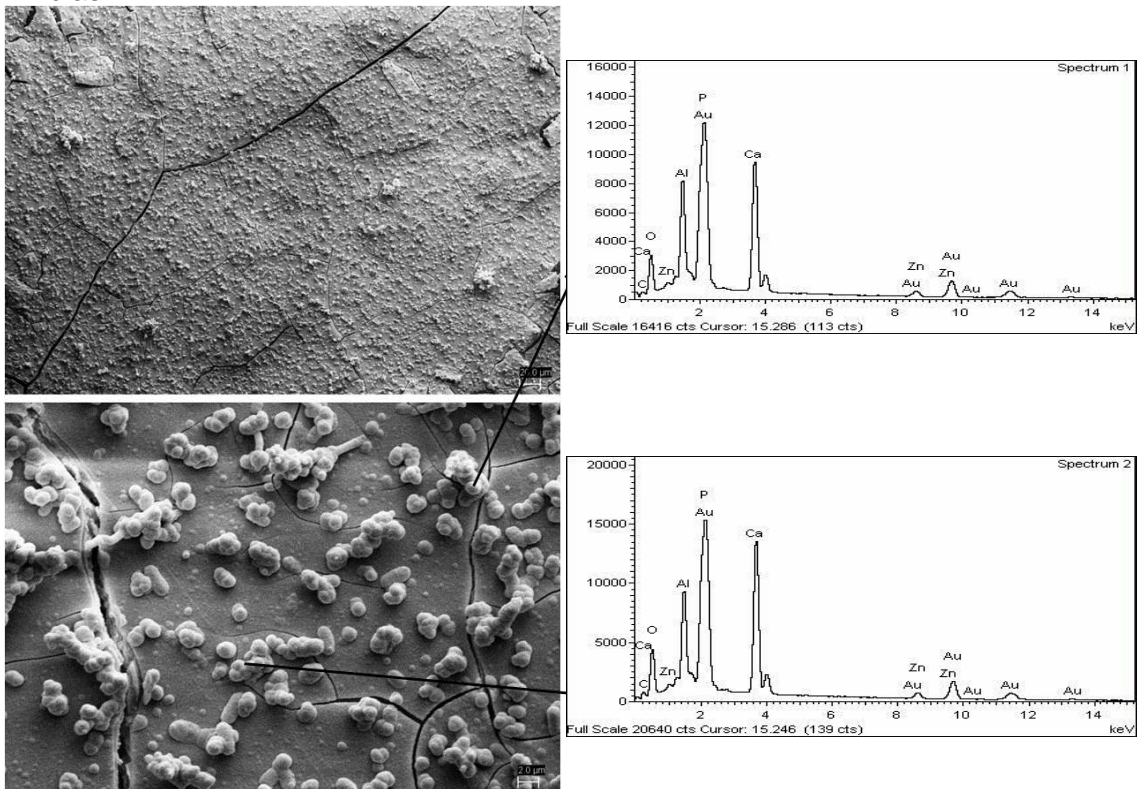
Figura 12: Micrografia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra CACH-ZnO (4%-p), após contato com SBF, por 21 dias.



Fonte: Autor.

Na Figura 12 podemos observar que a composição CACH-ZnO (4%-p), após o contato com o SBF, favoreceu a formação de apatita na superfície do material, e que o radiopaco ZnO não prejudica a formação do fosfato, como verificado no gráfico os picos de Ca e de P.

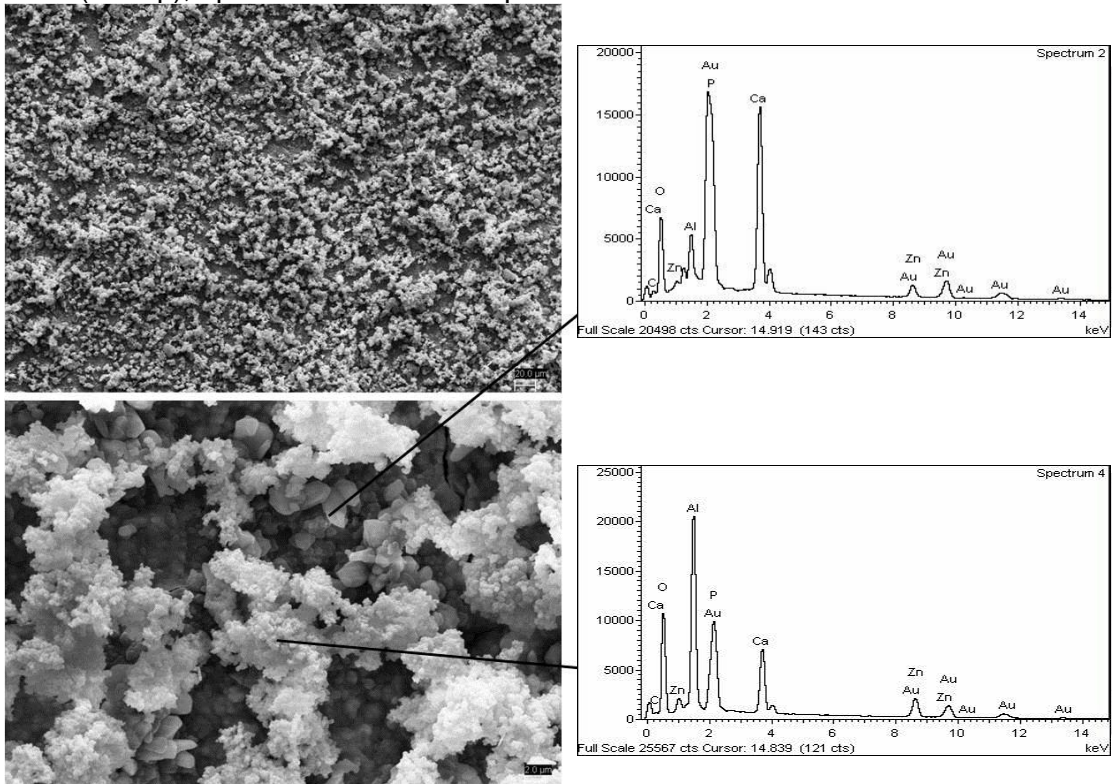
Figura 13: Micrografia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra CACH-ZnO (4%-p), após contato com solução de silicato de sódio por 7 dias e SBF por 21 dias.



Fonte: Autor.

Na Figura 13 podemos observar que a composição CACH-ZnO (4%-p), após o contato com o SBF/SS, favoreceu a formação de apatita, Íons de silicato contem grupos silanol que são liberados do vidro bioativo e adsorvidos na superfície do substrato para induzir a formação de apatita e que o radiopaco ZnO não prejudica a formação desses fostatos Ca e de P, como demonstrado nos picos do gráfico.

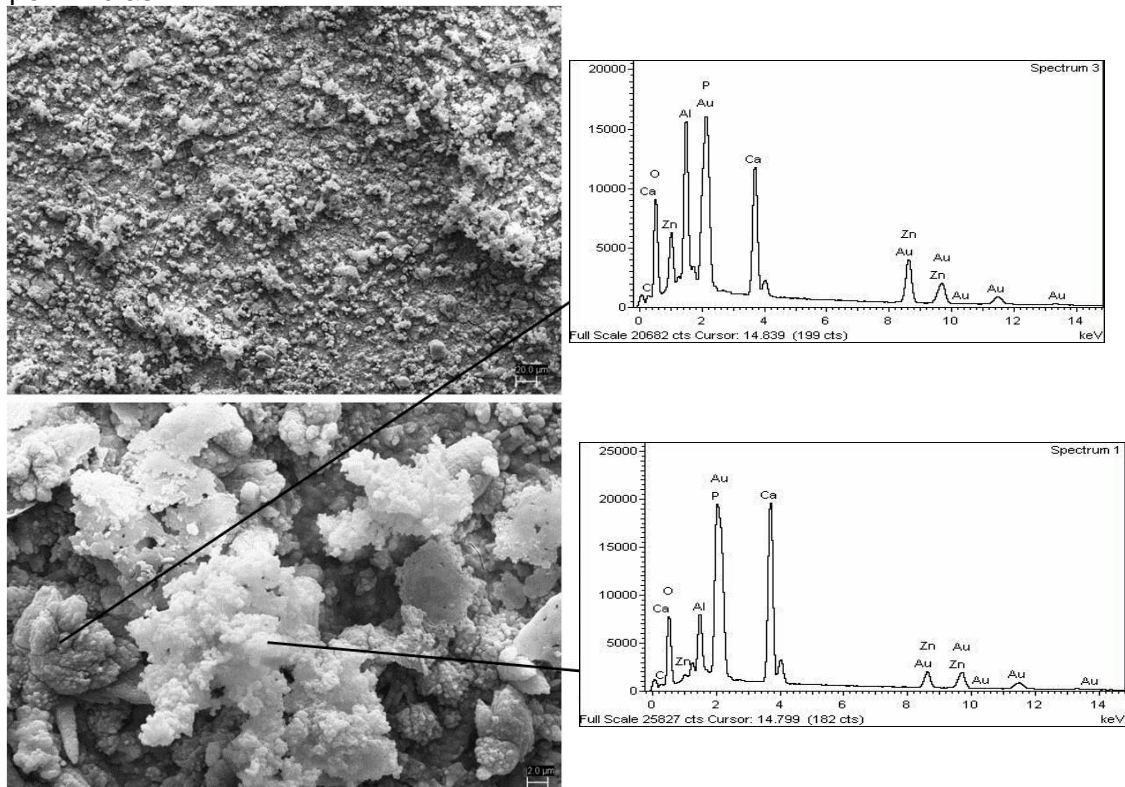
Figura 14: Micrografia eletrônica de varredura e espectro EDS para a amostra CACH-ZnO (25%-p), após contato com SBF por 21 dias.



Fonte: Autor.

Na Figura 14 podemos observar que a composição CACH- ZnO (25%-p), após o contato com o SBF, precipitou fosfatos, observados pelos picos de Ca e P que estão presentes no gráfico. Estes picos são característicos da formação de HA.

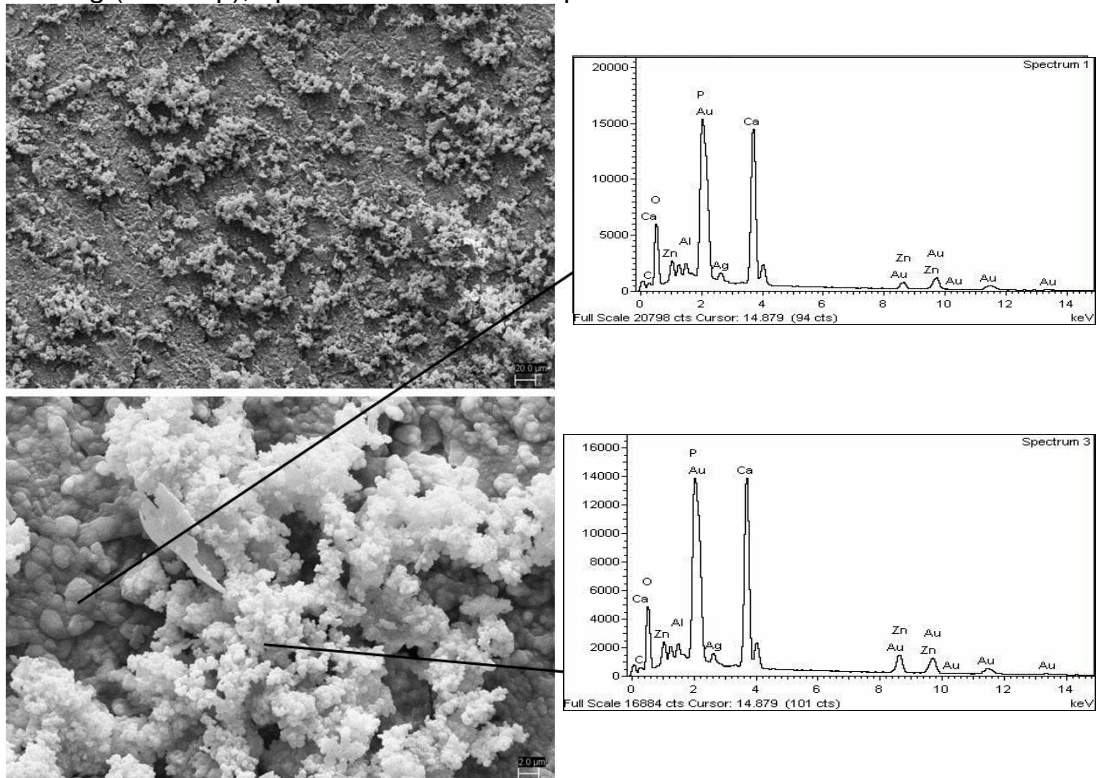
Figura 15: Micrografia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra CACH-ZnO (25%-p), após contato com solução de silicato de sódio, por 7 dias e SBF por 21 dias.



Fonte: Autor.

Na Figura 15 podemos observar que a composição CACH- ZnO (25%-p), após o contato com o SBF/SS, o composto contendo CaO-SiO_2 favoreceu o recobrimento de fosfato de cálcio, induzindo a nucleação de apatita sobre o material.

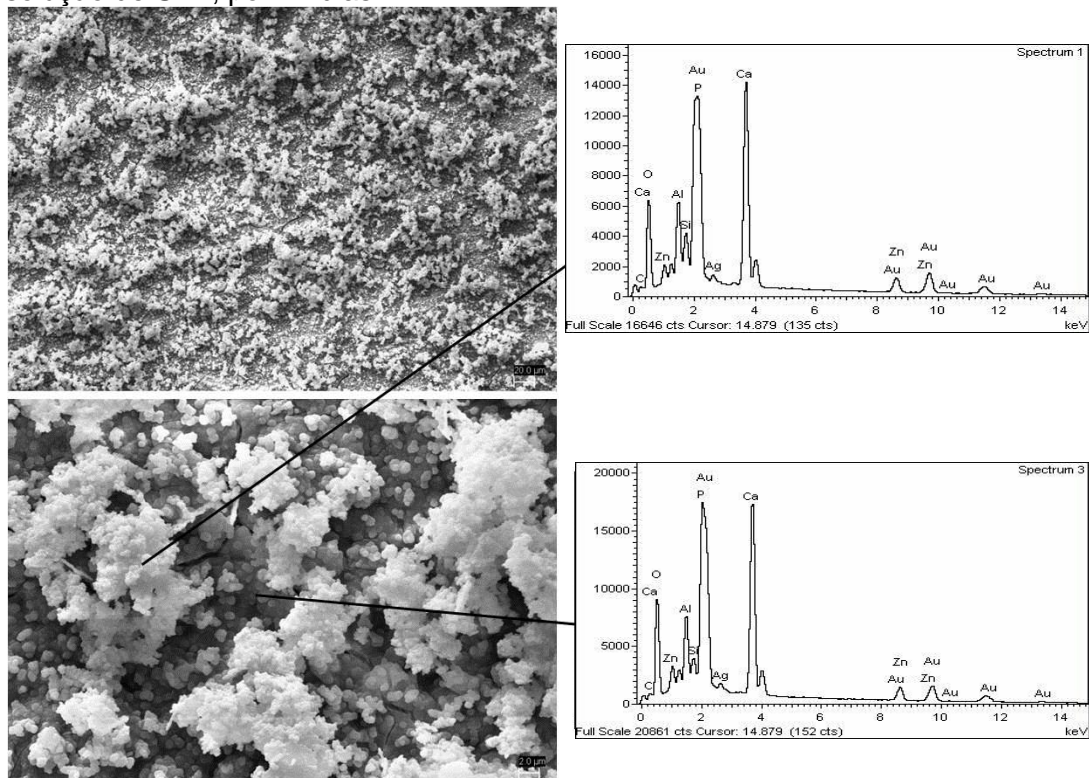
Figura 16: Micrografia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra de ZnO-Ag (25:1%-p), após contato com SBF por 21 dias.



Fonte: Autor.

Na Figura 16 podemos observar que a composição ZnO-Ag (25:1%-p), após o contato com o SBF, favoreceu a formação de apatita na superfície do material, e que os radiopacos ZnO e Ag não prejudicam a formação do fosfato, como verificado no gráfico os picos de Ca e de P.

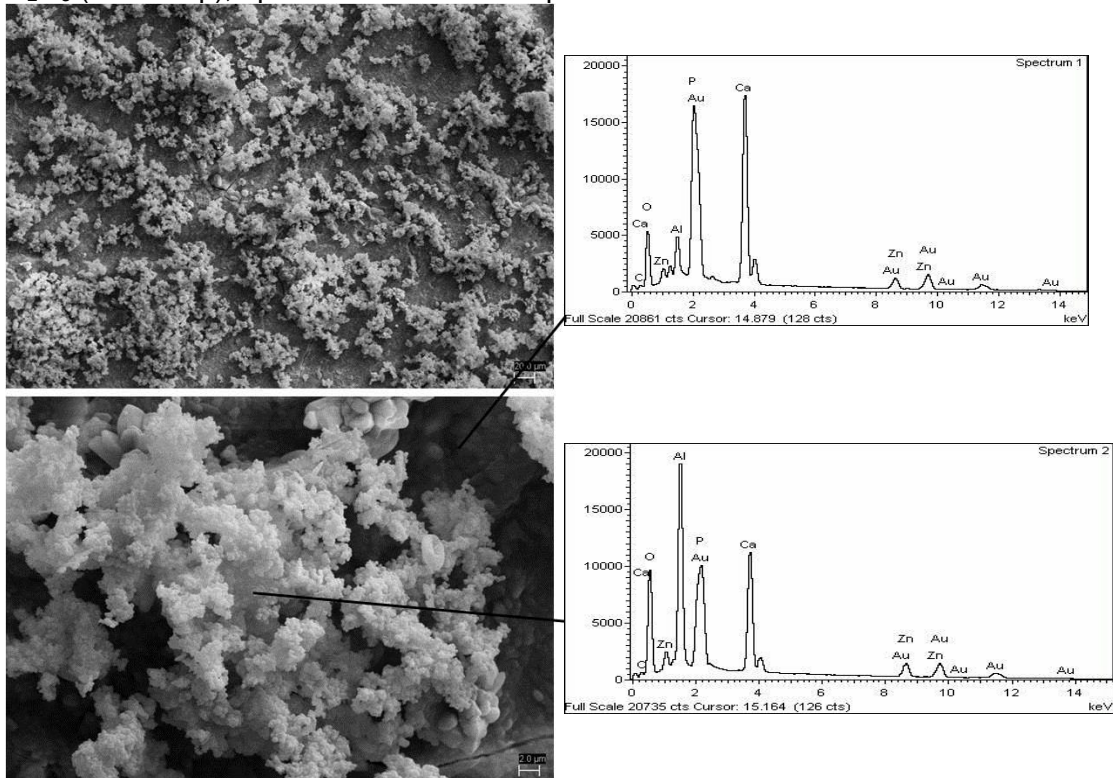
Figura 17: Micrografia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra ZnO-Ag (25:1%-p), após contato com solução de silicato de sódio, por sete dias, e com solução de SBF, por 21 dias.



Fonte: Autor.

Na Figura 17 podemos observar que a composição ZnO-Ag (25:1%-p), após o contato com o SBF/SS, o composto contendo CaO-SiO_2 favorece o recobrimento de fosfato de cálcio, induzindo a nucleação de apatita sobre o material, e que os radiopacos ZnO e Ag não prejudicam a formação do fosfato.

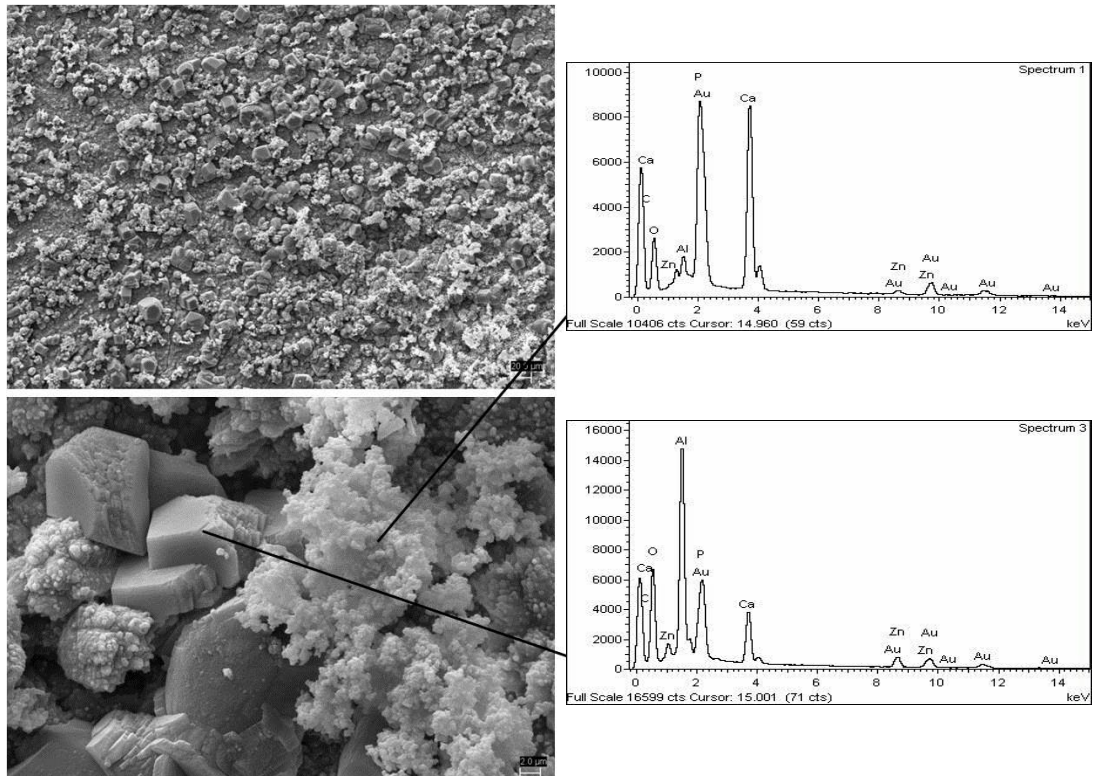
Figura 18: Micrografia eletrônica de varredura e espectro de EDS para a amostra ZnO-Bi₂O₃ (15:10%-p), após contato com SBF por 21 dias.



Fonte: Autor.

Na Figura 18 podemos observar que a composição ZnO-Bi₂O₃ (15:10%-p), após o contato com o SBF, precipitou fosfatos, sobre a superfície do material, demonstrados no gráfico pelos picos de Ca e P. Estes picos são característicos da formação de HA.

Figura 19: Micrografia eletrônica de varredura e espectro de EDS, para a amostra ZnO-Bi₂O₃ (15:10%-p), após contato com solução de silicato de sódio por 7 dias, e SBF, por 21 dias.



Fonte: Autor.

Na Figura 19 podemos observar que a composição ZnO-Bi₂O₃ (15:10%-p), após o contato com o SBF/SS, o composto contendo CaO-SiO₂ favorece a geração de hidroxiapatita no meio SBF, a qual pode estimular a deposição de tecido mineralizado na superfície do material e induzir futura integração com os componentes *in vivo*.

Um recobrimento de fosfato de cálcio foi observado pela primeira vez por um processo biomimético usando um vidro bioativo composto por CaO-SiO₂ que foi colocado em contato com um substrato para induzir a nucleação de apatita sobre ele em SBF. Íons silicato contem grupos silanol que devem ser liberados do vidro bioativo e adsorvidos na superfície do substrato para induzir a formação de apatita (64).

A fase de silicato (Ca₂SiO₄) favorece a geração de hidroxiapatita no meio SBF, a qual pode estimular a deposição de tecido mineralizado na superfície do material e induzir futura integração com os componentes *in vivo* (43, 65).

No entanto, há um outro método biomimético em que o agente nucleante é uma solução de silicato de sódio. Ao utilizar uma solução de silicato de sódio, a precipitação e o crescimento das fases de apatita são promovidos pela imersão da superfície cerâmica em SBF. Este procedimento é utilizado, de modo que as reações podem ocorrer da seguinte forma: i) adsorção de íons silicatos da solução sobre a superfície de cerâmica; ii) a nucleação de hidroxiapatite nos íons adsorvidos e iii) crescimento dos núcleos de hidroxiapatita e o aumento da espessura da camada. Os grupos Si-OH, formados pela adsorção dos íons da solução SS, sobre a superfície cerâmica, induzir a nucleação de apatita. Após a formação dos núcleos de apatita, o seu crescimento é espontâneo, como consequência da deposição subsequentes de íons cálcio e fosfatos que se encontram presentes na solução (66).

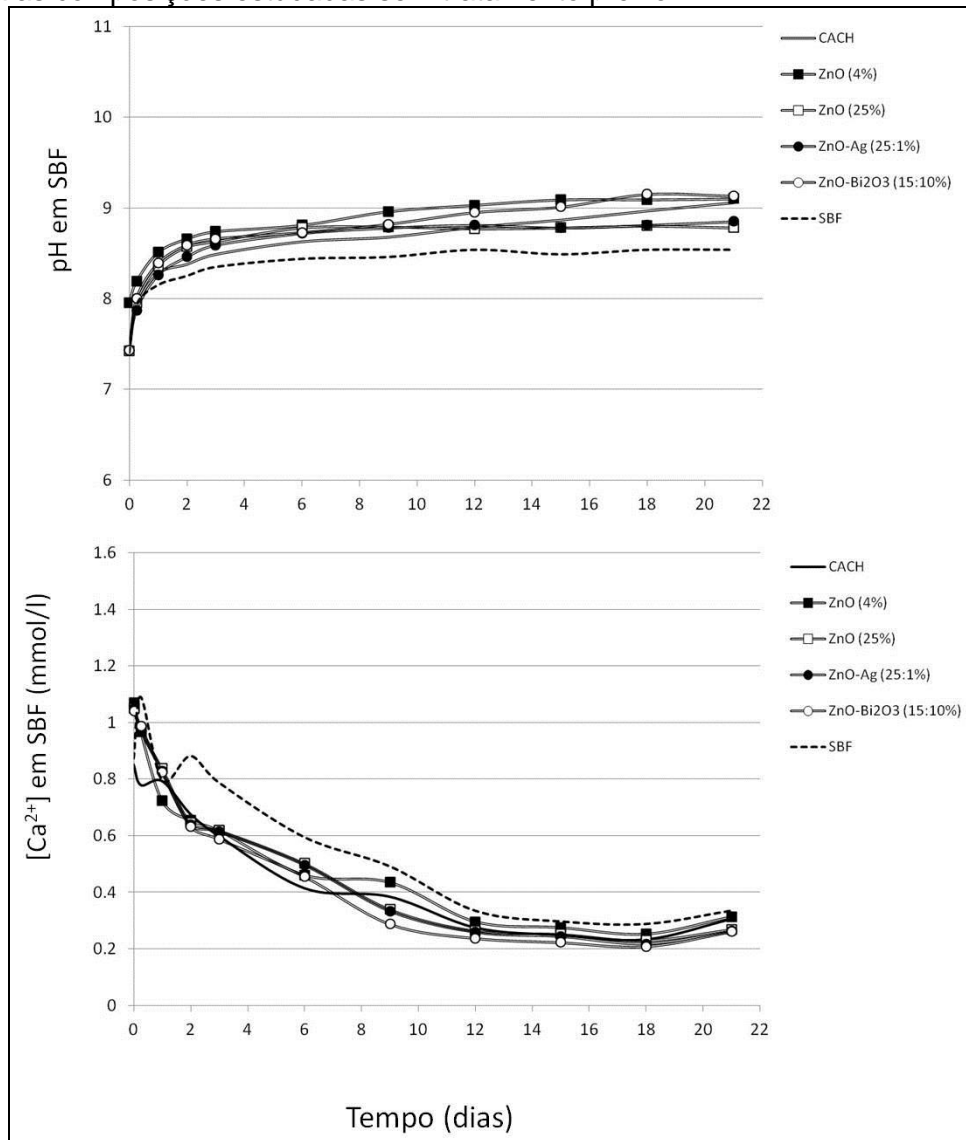
Uma alternativa para se verificar a precipitação de apatita em amostras bioativas é por meio de medidas de pH da solução SBF em contato com as amostras. O aumento do pH da solução de SBF, após contato com um material bioativo, promove a precipitação de apatita na superfície do material.

As reações superficiais que ocorrem durante o teste *in vitro* (contato do material com a solução SBF) também podem ser acompanhadas por meio das alterações da concentração do íon Ca^{2+} presente na solução SBF. A análise química quantitativa do íon cálcio, em função do tempo de ensaio, permite estabelecer uma relação com os estágios de formação da camada de fosfato de cálcio (67).

Quando um material bioativo é colocado em contato com SBF, inicialmente, ocorre um aumento da concentração de íons cálcio na solução SBF, devido à migração desses íons, da amostra para a solução. Posteriormente, ocorre uma combinação/reação desses íons com PO_4^{-3} presentes no líquido resultando na precipitação de uma camada de fosfato de cálcio na superfície da amostra (67, 68). O decréscimo de íons Ca^{2+} no meio SBF indica o consumo dessas espécies para a geração de apatitas na superfície das amostras.

De fato, aumento do pH e decréscimo na concentração de íons Ca^{2+} foi verificado para SBF após contato com todas as composições estudadas, quando comparado ao SBF sem contato com amostras. A variação de pH e concentração de íons Ca^{2+} da solução SBF após contato com as amostras sem tratamento prévio ou com tratamento com solução de silicato de sódio é apresentada nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

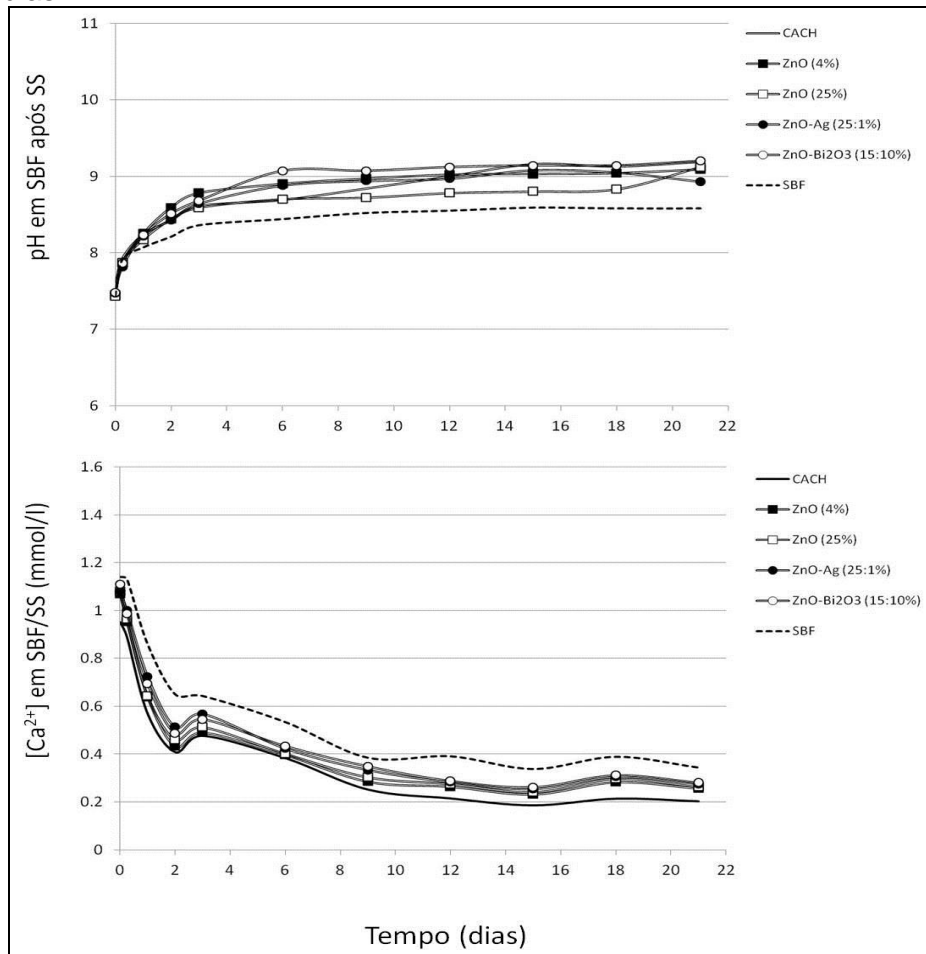
Figura 20: Variação de pH e concentração de íons Ca^{2+} em SBF em função do tempo, para as composições estudadas sem tratamento prévio.



Fonte: Autor.

Na Figura 20, o aumento da concentração de íons cálcio na solução SBF, ocorre devido à migração de íons, da amostra para a solução. Ocorrendo uma combinação/reação desses íons com PO_4^{-3} presentes no líquido resultando na precipitação de uma camada de fosfato. E o decréscimo de íons Ca^{2+} no meio SBF indica o consumo dessas espécies para a geração de apatitas na superfície das amostras.

Figura 21: Variação de pH e concentração de íons Ca^{2+} em SBF em função do tempo, para as composições estudadas após tratamento com solução de silicato de sódio (SS) por 7 dias.



Fonte: Autor.

Na Figura 21, o mesmo acontece com as amostras tratadas com solução SBF/SS, ocorre aumento da concentração de íons. Resultando na precipitação de uma camada de fosfato. E o decréscimo de íons Ca^{2+} no meio SBF/SS indica o consumo dessas espécies para a geração de apatitas na superfície das amostras.

A presença da assinatura Raman em 960 cm^{-1} correspondente ao grupo fosfato também confirma a formação de camada de apatita na superfície das amostras após imersão em SBF antes e após tratamento com solução de silicato de sódio, como apresentado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

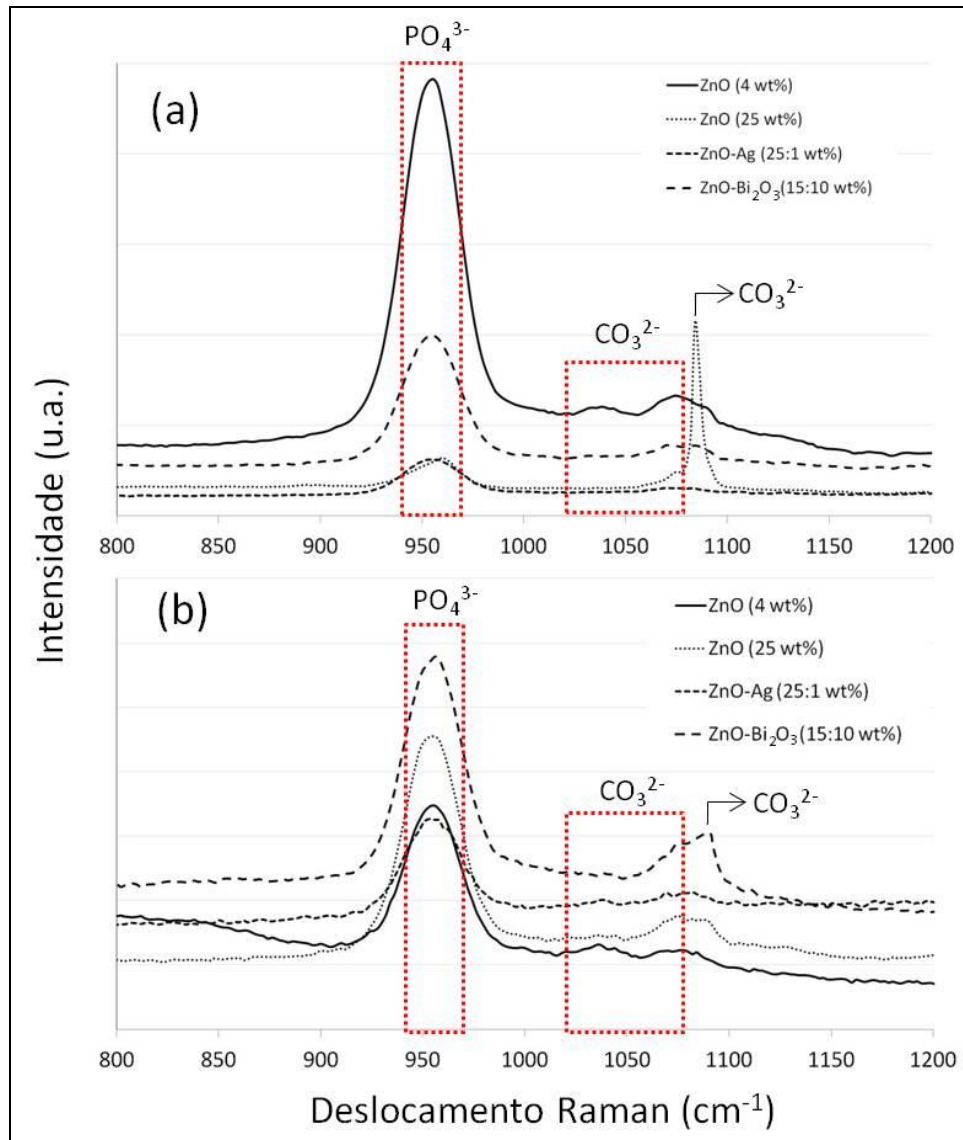
Na região entre 900 e 1100 cm^{-1} é esperado a contribuição dos grupos funcionais PO_4^{3-} e CO_3^{2-} da hidroxiapatita carbonatada (69, 70). A hidroxiapatita carbonatada é a principal fase mineral do osso, o qual é um composto biocerâmico que também consiste de fase orgânica, principalmente colágeno (63). Substituição

tipo-B é a espécie carbonato mais abundante no osso e ocorre quando íons fosfato (PO_4^{3-}) presentes nos cristais de apatita são substituídos por íons (CO_3^{2-}) (71).

Os espectros Raman dos principais modos de vibração de fosfatos e carbonatos da hidroxiapatita carbonatada mostram picos a 586 cm^{-1} atribuído a vibração $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ e pico a 960 cm^{-1} relacionado a vibração $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$. Os picos a 1043 e 1073 cm^{-1} são atribuídos aos modos de vibração *bending* e *stretching* do carbonato (CO_3^{2-} , carbonato tipo-B), respectivamente (72).

No presente trabalho, também foram verificados picos a 1043 e 1073 cm^{-1} indicando a formação de hidroxiapatita carbonatada. Além disso, picos correspondentes ao grupo carbonato do carbonato de cálcio (CaCO_3) a 1088 cm^{-1} (73) foram verificados para as amostras ZnO (25%-p, **Erro! Fonte de referência não encontrada.a**) e ZnO-Bi₂O₃ (15:10%-p, **Erro! Fonte de referência não encontrada.b**).

Figura 22: Espectros Raman da superfície das composições estudadas após tratamento em SBF sem ou com tratamento prévio com solução de silicato de sódio (SS) por 7 dias.



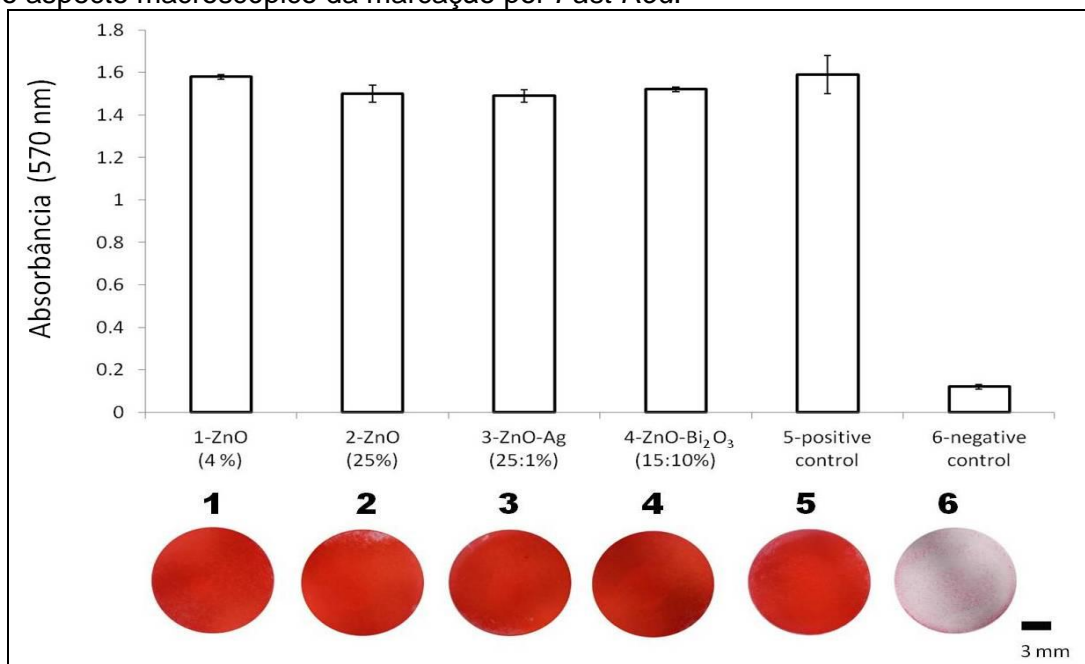
Fonte: Autor.

Na Figura 22 (a, b), a região de 960 cm^{-1} corresponde ao grupo fosfato confirmando a presença destas fases na superfície das composições. Os picos 900 e 1100 cm^{-1} são atribuídos a HA carbonatada quando íons fosfato (PO_4^{3-}) presentes nos cristais de apatita são substituídos por íons (CO_3^{2-})

5.5 Viabilidade celular

A viabilidade de osteoblastos humanos (ATCC-HTB-85), obtida por meio do teste de MTT, em contato com as amostras por 24 horas, é mostrada na Figura 21, juntamente com a avaliação qualitativa da atividade de fosfatase alcalina (ALP) *in situ* por marcação com *Fast red*.

Figura 23: Viabilidade celular de cultura de osteoblastos humanos (ATCC-HTB-85) após exposição direta às amostras, e ao DMSO (CN, controle negativo), ou não expostas (CP, controle positivo) durante 24 horas, apresentados como absorvância média \pm desvio padrão, além do aspecto macroscópico da marcação por *Fast Red*.



Fonte: Autor.

Na Figura 23, observa-se maior viabilidade celular para a amostra 4%ZnO apresentando nenhuma diferença significativa em comparação com o controle positivo. Por outro lado, para as amostras 25%ZnO, ZnO-Ag e ZnO-Bi₂O₃ foi observada redução na viabilidade celular comparada com controle positivo. A atividade ALP capaz de induzir a mineralização celular, foi homogênea e intensa na marcação para todas as composições, não tendo diferenças significativas qualitativamente.

O ensaio com MTT é um ensaio colorimétrico para avaliar a atividade metabólica de células (76). Os resultados mostram que, após 24 horas, as culturas expostas às composições exibiram viabilidades celular significativamente superiores ao controle negativo (CN).

Os resultados também mostram maior viabilidade celular para a amostra 4%ZnO ($1,58 \pm 0,01$) apresentando nenhuma diferença significativa em comparação com o controle positivo (CP, $p > 0,05$). Por outro lado, para as amostras ZnO25%, ZnO-Ag e ZnO-Bi₂O₃ foi observada redução significativa na viabilidade celular em comparação com CP ($p = 0,005, 0,003$ e $0,037$, respectivamente).

De acordo com a literatura, nanopartículas de prata (50 nm), exibem fortes efeitos citotóxicos em osteoblastos e osteoclastos, enquanto fracos efeitos citotóxicos são observados para micropartículas de prata (3 μ m) (77). Cimento contendo óxido de bismuto reduziram a viabilidade celular sugerindo algum efeito citotóxico. No entanto, a camada bioativa espessa formada após 28 dias em SBF reduziu o efeito deletério do óxido de bismuto no crescimento das células (78). A combinação de dados de viabilidade celular, assim como as observações morfológicas de células osteoblásticas humanas em cultura sugere que os compósitos hidroxiapatita-ZnO, contendo 10%-p ou menos de ZnO apresentam a capacidade de suportar a adesão de células e proliferação (79).

No que diz respeito às respostas biológicas *in vitro*, além da viabilidade celular, a avaliação qualitativa da atividade de ALP *in situ*, por marcação com *Fast red*, também é importante para avaliar os danos das células e o potencial de ação biológica de vários materiais.

A fosfatase alcalina é um importante marcador da atividade de osteoblastos e, conseqüentemente, de formação óssea (80). Trata-se de uma glicoproteína presente na membrana plasmática de células de osteoblastos, que possui papel importante no processo de mineralização: a hidrólise de fosfatos ésteres orgânicos, resulta numa alta concentração local de fosfatos inorgânicos, facilitando a precipitação de fosfato de cálcio (81), destruição fisiológica de fatores inibitórios do crescimento celular como pirofosfato inorgânico e adenosina trifosfato, através da atividade de hidrolases, e atua ainda no transporte de fosfato inorgânico e do cálcio. A presença de níveis elevados desta enzima parece ser necessária para iniciar o processo de mineralização de tecidos conjuntivos (82), uma vez que é responsável pelo aumento local de fosfato inorgânico, para a nucleação dos cristais de hidroxiapatita (83). Participa ainda dos processos de adesão, migração e diferenciação de osteoblastos (80).

A atividade ALP induzida por uma composição específica poderia demonstrar a superior capacidade para induzir a mineralização na linhagem celular utilizada. No

entanto, observou-se uma homogênea e intensa marcação para todas as composições, não sendo detectadas diferenças significativas qualitativamente.

5.6 Viabilidade bacteriana

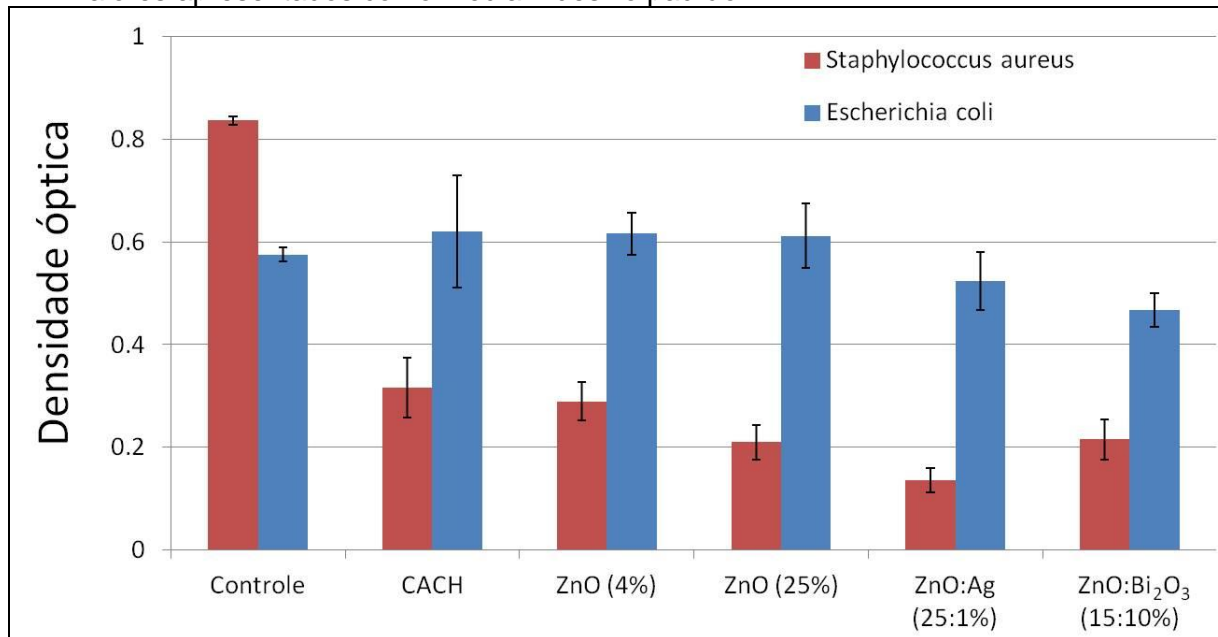
A Figura 24 mostra os resultados de densidade óptica média para as amostras das composições em contato com os microrganismos *S. aureus* e *E. coli*. O aumento do número de células de uma cultura bacteriana pode ser monitorado por medidas da densidade óptica. A densidade óptica aumenta proporcionalmente ao número de células na população resultando em maior valor de crescimento (%).

Staphylococcus aureus (Gram-positiva) é a mais comum e uma das mais antigas bactérias simbiontes do homem, sendo uma bactéria esférica (coccus) que aparece aos pares no exame microscópico, em cadeias curtas ou em cachos similares aos da uva ou em grupos. Algumas cepas produzem uma toxina proteica altamente termoestável, que causa doença em humanos.

Escherichia coli é uma bactéria bacilar gram-negativa, que assume a forma de um bacilo e pertence à família das Enterobacteriaceae. São aérobias e anaerobias facultativas. Não é uma bactéria comum da cavidade bucal, mas pode estar presente principalmente em indivíduos mais velhos ou clinicamente comprometidos.

Os resultados obtidos mostram que, após 24 horas de exposição, menor crescimento foi verificado para o *S. aureus* na presença das composições, o que indica um efeito bacteriostático superior quando comparado a *E. coli*. Todas as composições apresentaram diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$). Por outro lado, para *E. coli* não foi verificada diferença significativa entre o controle e as composições.

Figura 24: Medidas de densidade óptica de crescimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, em contato com as composições estudadas. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.



Fonte: Autor.

Na Figura 24, os resultados obtidos mostram que, após 24 horas de exposição, menor crescimento foi verificado para o *S. aureus* na presença das composições, o que indica um efeito bacteriostático superior quando comparado a *E. coli*.

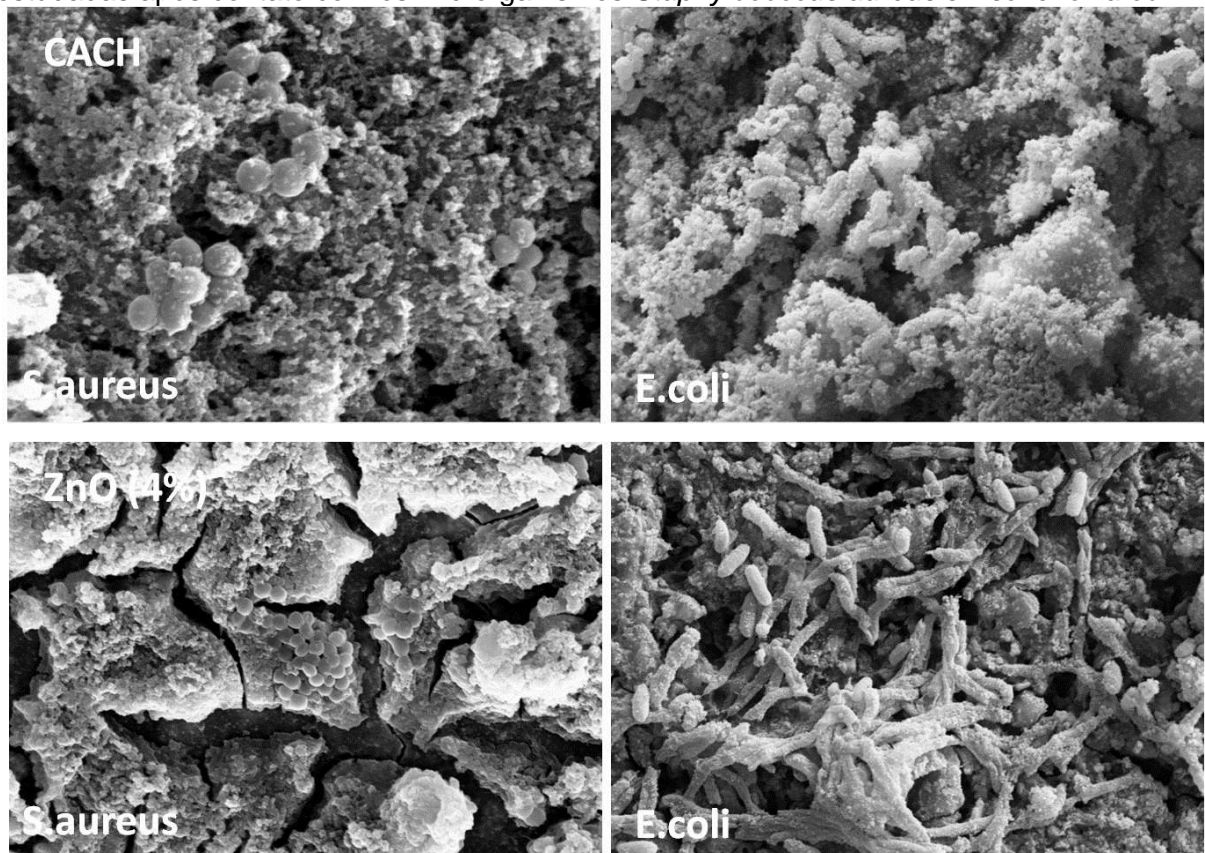
Entre os compostos mais eficientes contra *S.aureus*, destaca-se o óxido de zinco. Esse material na forma de pó tem sido utilizado como ingrediente ativo de medicamentos de aplicação dermatológica devido a sua atividade antibacteriana (84). Partículas de óxido de zinco tem se mostrado efetivas no controle de vários microrganismos (84), por apresentarem a capacidade de mudar os componentes da membrana celular da bactéria e distorcê-la levando à perda do componente intracelular e conseqüentemente à morte (85). Entre as vantagens desse material soma-se o fato do mesmo ser não tóxico e biocompatível (86).

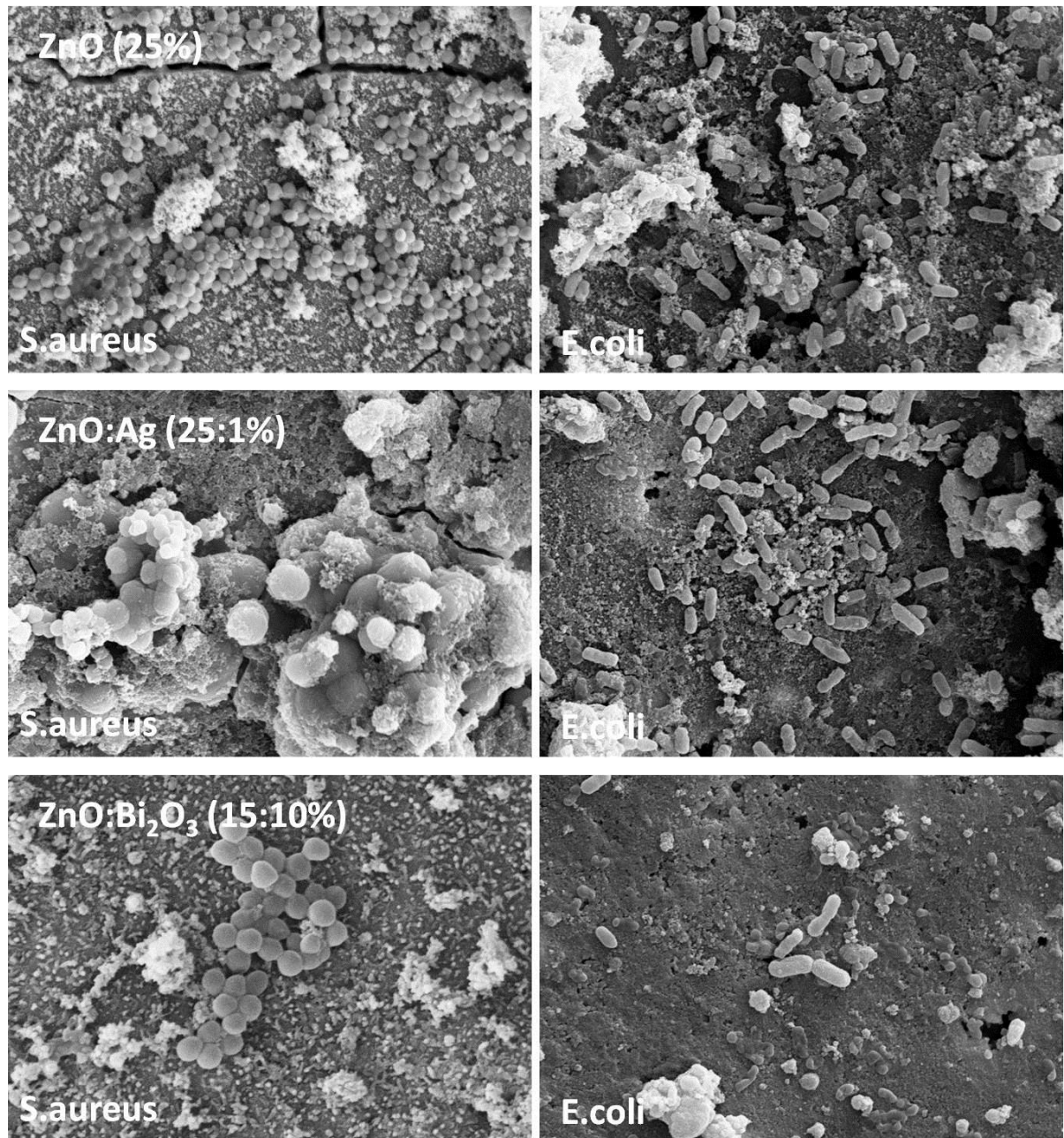
A composição ZnO-Ag proporcionou o melhor efeito contra *S.aureus* com uma diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado a composição 4%-pZnO. Enquanto para a *E. coli*. menor valor de densidade óptica foi verificado na presença da composição ZnO-Bi₂O₃, a qual também mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) comparado a composição 4%-pZnO.

Resultados de medidas de halo de inibição de crescimento bacteriano para amostras de CAC contendo Ag (1 e 2 %-p) com tamanho de partículas de 0,7 μm , mostrou efeito bactericida para *S. aureus* (87). Entretanto, a atividade bactericida da prata tem se mostrado inversamente proporcional ao seu tamanho, sendo mais efetiva para partículas menores que 0,1 μm (87). Isso ocorre tanto pela maior área de superfície como pela carga elétrica que as partículas apresentam o que favorece a ligação com a parede celular das bactérias (88).

As análises por meio de microscopia eletrônica de varredura realizadas na superfície das amostras após contato com as culturas de microrganismos são apresentadas na Figura 25. Pode-se observar que no geral as micrografias apresentam uma menor adesão de microrganismos *S. aureus* quando comparado a *E. coli*, confirmando os resultados apresentados. Menor adesão de microrganismos foi verificada para a composição ZnO:Bi₂O₃ (15:10%).

Figura 25: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das composições estudadas após contato com os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.





Fonte: Autor.

Na Figura 25, as composições revelaram efeito bacteriostático mais eficaz contra o microrganismo *S. aureus* quando comparado a *E. coli*. A composição ZnO-Ag proporciona melhor efeito contra *S. aureus* quando comparado a bactéria *E. coli*. E menor valor de densidade óptica é verificado na presença da composição ZnO-Bi₂O₃ demonstrando melhor efeito bactericida.

6 CONCLUSÃO

O aumento do teor de ZnO de 4 para 25%-p não resulta em melhora na sua radiopacidade. Por outro lado, a composição ZnO-Bi₂O₃ (15:10%-p) apresenta valor adequado da radiopacidade para fins clínicos (> 3 mmAl) enquanto a composição ZnO-Ag (25: 1%-p) mostra apenas radiopacidade mínima requerida (cerca de 3 mmAl). Entretanto, esta última composição conduz a vantagens adicionais de não promover a diminuição da resistência mecânica e de ser adicionado em teor muito menor comparado ao Bi₂O₃.

As composições contendo aditivos radiopacos apresentam superior decréscimo na porosidade e tamanho médio dos poros após a interação com SBF, indicando a precipitação de apatita na superfície dos materiais (bioatividade), que pode revestir a superfície sólida e preencher os poros. A bioatividade é também indicada pelo aumento de pH e decréscimo na concentração de íons Ca²⁺ em SBF antes e após tratamento com solução de silicato de sódio (SBF/SS).

Os resultados de MEV confirmam a precipitação de fases de fosfato na superfície de todas as composições estudadas. A identificação de íons cálcio e principalmente fósforo por EDS e a presença da assinatura Raman a 960 cm⁻¹, correspondente ao grupo fosfato, confirmam a formação de uma camada de apatita nas amostras após imersão em SBF ou SBF/SS.

Em relação aos resultados de viabilidade de células osteoblásticas, as composições ZnO (25%), ZnO-Ag e ZnO-Bi₂O₃ apresentam viabilidade celular ligeiramente inferior em relação ao controle e a composição ZnO (4%). As composições não apresentam diferenças qualitativas significativas para a atividade de ALP.

As composições revelaram efeito bacteriostático mais eficaz contra o microrganismo *S. aureus* quando comparado a *E. coli*. A composição ZnO-Ag proporciona melhor efeito contra *S. aureus* enquanto para a *E. coli* menor valor de densidade óptica é verificado na presença da composição ZnO-Bi₂O₃.

Os aditivos Ag e Bi₂O₃ combinados com ZnO podem ser utilizados para otimizar a radiopacidade do CAC sem prejuízo de suas demais propriedades avaliadas neste trabalho.

7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Uma vez que a adição de aditivos radiopacos ao CACH apresentou bons resultados em relação às propriedades avaliadas neste trabalho, estudos *in vitro* ainda são necessários para avaliar outras propriedades como: proliferação celular, mineralização, expressão de genes relacionados à diferenciação celular, além de ensaios *in vivo*.
- As composições avaliadas neste trabalho também podem ser combinadas visando melhorar ainda mais as propriedades do biomaterial.

REFERÊNCIAS

- 1 TAN, Y. N. et al. Hydroxyapatite formation on surface of calcium aluminate cements. **Advances in Applied Ceramics**, v. 110, n. 8, p. 464-468, 2011.
- 2 LOOF, J. **Calcium-aluminate as biomaterial: Synthesis, Design and Evaluation**. 2008,. 88f. Dissertação (Mestrado) Acta Univertitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations From the Faculty of Science and Technology, Upssala, 2008.
- 3 KOPANDA, J. E.; MACZURA, G. Production processes, properties, and applications for calcium aluminate cements. In: HART, L. D.; LENSE, E. **Alumina Chemicals Science and Tecnology Handbook**. New York: Wiley-American Ceramic Society, 1990.
- 4 ENGQVIST, H. et al. Chemical and biological integration of a mouldable bioactive ceramic material capable of forming apatite in vivo in teeth. **Biomaterials**, v. 25, n.14, p. 2781-2787, 2004.
- 5 PARREIRA, R. M. et al. Calcium aluminate cement-based compositions for biomaterial applications. **Ceramics International**, v. 42, p. 11732-11738, 2016.
- 6 SEABRA, D. E. A. **Estudos de bioatividade de nanoestruturas de óxido de zinco**. 2013 92 f. Dissertação (Mestrado em Materiais e Dispositivos Biomédicos), Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, Aveiro, 2013.
- 7 LACHOWSKI, K.M. et al. The absence of radiopacity of some glass ionomer cements. **Revista Assoc. Paulista Cir. Dent.**, v. 66, p. 24-29, 2012.
- 8 MESTIERI, L.B. et al. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. **J Appl Oral Sci.**, v. 22, p. 554-559, 2014.
- 9 CRUVINEL, D. R. et al. Evaluation of radiopacity and microhardness of composites submitted to artificial aging. **Mater. res.**, v.. 10, p. 325-329, 2007.
- 10 TIRAPELLI, C. et al. Radiopacity and microhardness changes and effect of X-ray operating voltage in resin-based materials before and after the expiration date. **Materials Research**, v. 7, p. 409-412, 2004.
- 11 AGUILAR, F. G. et al. Radiopacity evaluation of calcium aluminate cement containing different radiopacifying agents. **Journal of Endodontics**, v. 37, p. 67-71, 2011.
- 12 VAN NOORT, R.; BARBOUR, M. E. **Introduction to dental materials**. 14th. ed. London: Mosby Elsevier, 2013.
- 13 OLIVEIRA, I. R. et al. Influence of radiopacifier additives on calcium aluminate cement properties. **Materials Research**, v. 17, p. 1295-1301, 2014.
- 14 CAMILLERI, J.; GANDOLFI, M. G. Evaluation of the radiopacity of calcium silicate cements containing different radiopacifiers. **Int. endod. j.**, v. 43, p. 21-30, 2010.

- 15GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Quím. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.
- 16LU, L.; MIKOS, A. G. The importance of new processing techniques in tissue engineering. **MRS Bull**, v. 21, n.11, p. 28-32, 1996.
- 17THOMSON, R. C, et al. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. **J. Biomater. Sci Polym.**, v. 7, n.1, p.23-38.1995.
- 18HENCH, L. L; WILSON, June (Ed.). **An Introduction to bioceramics**. Singapore, SG: World Scientific, c1993.
- 19DEVILLE, S. et al. Low-temperature ageing of zirconia-toughened alumina ceramics and its implication in biomedical implants. **J. Eur. Ceram. Soc.**, v. 23, p. 2975-2982, 2003.
- 20HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **J. am. Ceram. Soc.**, v. 74, p. 1487-1510, 1991.
- 21KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quím. Nova**, v. 23, p. 518-522, 2000.
- 22THAMARAISELVI, T. V.; RAJESWARI, S. Biological evaluation of bioceramic materials– review. **Trends Biomater. Artif. Organs.**, v.18, n.1, p. 9-17, 2004.
- 23GANDOLFI, M. G. et al. Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 108, n.6, p. e39-45, 2009.
- 24ROY, D. M. New Strong Cement Materials: Chemically Bonded Ceramics. **Science**, v. 235, p. 651-658, 1987.
- 25CHOW, L. C.; TAKAGI, S. A. Natural Bone Cement—A Laboratory Novelty Led to the Development of Revolutionary New Biomaterials. **J Res Natl Inst Stand Technol.**, v. 106, n. 6, p.1029-33, 2001.
- 26PANDOLFELLI, V. C. et al. Aluminous cement-based composition for application in endodontics and cementitious product obtained thereof. **WO2009067774-A2**. 27 nov. 2008, 4 jun. 2009.
- 27BURGER, C. P. et al . Cimento de aluminato de cálcio: uso em defeitos ósseos induzidos em fêmur de coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 3, p. 757-762, jun. 2013.
- 28O'DRISCOLL, M. Alumina Cements - Lining up Against Steel and Sewage. **Industrial Minerals**, v. 399, p.35-45, Dec. 2000.
- 29BUHR, A. et al.. BONITE - A New Material Alternative for Refractory Innovations. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON REFRACTORIES, 47., 2004, Aachen. **Proceedings...** Düsseldorf: Verlag Stahleisen GmbH. 2004, pp. 205-209.
- 30PENA, P.; DE AZA, A.H. Cemento de Aluminatos Cálcicos. Constitución, Características y Aplicaciones. In: BAUDIN, C. **Refractarios Monolithics**. Madrid: Sociedad Española de Ceramica y Vidrio, 1999. p. 85-106.
- 31LEE, W. E. et al. Castable refractory concretes. **Int. mater. rev.**, v.46, p.145-167, 2001.

- 32 SINGH, V. K.; MANDAL, U.K. Hydration and some other properties of CA and CA2 and their mixes. **Transactions of the Indian Ceramic Society**, v. 43, p. 15-18, 1984.
- 33 GARCIA, J. R. et al. Processo de hidratação e os mecanismos de atuação dos aditivos aceleradores e retardadores de pega do cimento de aluminato de cálcio. **Cerâmica**, v. 53, p. 42-56, 2007.
- 34 ZHOU, H. et al. Investigation into the antibacterial property for carbon films. **Diam. Rel. Mater.**, v. 17, p. 1416-1419, 2008.
- 35 GRONBERG, K. S. **Calcium aluminate cement as dental restorative** - Mechanical properties and clinical durability. 2004. Dissertação (Mestrado) Umeå University, Sweden, 2004.
- 36 CASTRO-RAUCCI, L. M. et al. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, p. 99-104, 2011.
- 37 ENGQVIST, H. et al. Chemical stability of a novel injectable bioceramic for stabilisation of vertebral compression fractures. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 21, n.2, p. 98-106, 2008.
- 38 ITO, A. et al. Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. **Journal Biomed. Mater. Res.**, v. 50, p. 178-183, 2000.
- 39 ALVAREZ-PÉREZ, M. A. et al. Biocompatibility of zinc aluminate nanostructured. **Material J. Nano Res.**, v. 5, p. 169-176, 2009.
- 40 ATTAR, N.; TAM, L.E.; MCCOMB, D. Mechanical and physical properties of contemporary dental luting agents. **J. prosthet. dent.**, v. 89, n.2, p. 127-134, 2003.
- 41 TANOMARU-FILHO, Mario et al. Radiopacity evaluation of root-end filling materials by digitization of images. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 16, p. 376-379, 2008.
- 42 VIVAN, R.R. et al. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. **Oral surg. oral med. oral pathol. oral radiol. endod**, v. 108, p. 35-38, 2009.
- 43 LIU, W.; CHANG, J. Setting properties and biocompatibility of dicalcium silicate with varying additions of tricalcium aluminate. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 27, n. 2, p. 171-178, 2011.
- 44 BEYER-OLSEN, E. M.; ORTAVIK, D. Radiopacity of root canal sealers. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 51, p. 320-328, 1981.
- 45 MOREJÓN-ALONSO, L.; CARRODEGUAS, R.G.; SANTOS, L.A. Development and characterization of α -tricalcium phosphate / monocalcium aluminate composite bone cement. **J. Biomed. Sci. Eng.**, v. 5, p. 448-456, 2012.
- 46 MCLEAN, J.W.; GASSER, O. Glass-Cermet-cement (I). **Quintessenz**, v. 36, p. 2059-2068, 1985.
- 47 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO-6876**: dental root canal sealing materials. Geneve: ISO, 2001.

- 48 IKADA, Y. Surface Modification of Polymers for Medical Applications. **Biomaterials**, v.15, n.10, p.725-36, 1994.
- 49 CAO, W.; HENCH, L.L. Bioactive materials. **Ceramics International**, v, 33, n. 3, p. 493-507, 1996.
- 50 KOKUBO, T. Bioactive Glass-Ceramics - Properties and Applications. **Biomaterials**, v. 12, n.2, p. 155-163, 1991.
- 51 OHTSUKI, C.; KAMITAKAHARA, M.; MIYAZAKI, T. Bioactive ceramic-based materials with designed reactivity for bone tissue regeneration. **J. R. Soc. Interface**, v. 6, p. S349-S360, 2009.
- 52 WU, C., XIAO, Y. Evaluation of the in vitro bioactivity of bioceramics. **Bone and Tissue Regeneration Insights**, v. 2, p. 25-29, 2009.
- 53 KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, p. 2907-2915, 2006.
- 54 CASTRO-RAUCCI, L.M.S. et al. Osteogenic cell response to calcium aluminate-based cement. **Int Endod J.**, 2016.
- 55 TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.
- 56 SEITZ, H. e al. Different Calcium Phosphate Granules for 3-D Printing of Bone Tissue Engineering Scaffolds. **Advanced engineering materials**, v.11, n. 5, p. B41-B46, 2009.
- 57 SILVA, E. J. N. L. et al. Evaluation of cytotoxicity, antimicrobial activity and physicochemical properties of a calcium aluminate-based endodontic material. **J Appl Oral Sci.**, v. 22, p. 61-67, 2014.
- 58 RIGO, E. C. S, BOSCHI, A. O, YOSHIMOTO, M. Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. **Materials Science and Engineering**, v. 24, p. 647-651, 2004.
- 59 DA SILVA, R.A., et al. Effects of the association between a calcium hydroxide paste and 0,4% chlorhexidine on the development of the osteogenic phenotype in vitro. **Journal endodontic**, v. 34, p.1485-1489, 2008.
- 60 STANDARDIZATION., INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR. **ISO 6876:2012** . Dentistry: root canal sealing materials: International Organization for Standardization. Genève: ISO, 2012.
- 61 PEREIRA, E.C.S. **Estudo do longitudinal da deficiência estrogênica no fêmur de ratas**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São José dos Campos. 2011.
- 62 SURESH, K. G. et al. Synthesis and characterization of bioactive hydroxyapatite-calcite nanocomposite for biomedical applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 349, p. 56-62, 2010.
- 63 DEMIRTAS, T. T.; KAYNAK, G.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10xSBF-like solution by microwave irradiation. **Materials Science and Engineering:C.**, v. 49, p. 713-719, 2015.

- 64RUI, L.; REIS, J. S. R. **Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine**. New York: CRC Press, 2005.
- 65OLIVEIRA, I.R. et al. Bioactivity of calcium aluminate endodontic cement. **J. Endodontics**, v. 39, p. 774-778, 2013.
- 66SILVA, C. C. G. et al. Hydroxyapatite coating on silicon nitride surfaces using the biomimetic method. **Materials Research**, v. 11, p. 47-50, 2008.
- 67SILVA JUNIOR, P. E.; ORÉFICE, R. L. Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli(metacrilato de metila). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 3, p. 109-115, 2001.
- 68KHORAMI, M. In vitro bioactivity and biocompatibility of lithium substituted 45S5 bioglass. **Materials Science and Engineering C.**, v. 31, p. 1584–1592, 2011.
- 69PUCÁET, E.; REYNARD, B. B.; LÉCUYERA, C. Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites? **Chemical Geology**, v. 205, p. 83–89, 2004.
- 70MARKOVIC, S. et al. Synthetical bone-like and biological hydroxyapatites: a comparative study of crystal structure and morphology. **Biomed. Mater**, v. 6, n. 4, 2011.
- 71SILVA, M.J. **Skeletal Aging and Osteoporosis: Biomechanics and Mechanobiology**. New York: Springer, 2013.
- 72BERGER, S.B. et al. Effects of various hydrogen peroxide bleaching concentrations and number of applications on enamel. **Braz J Oral Sci.**, v. 13, p. 22-27, 2014.
- 73SUN, J. Z. et al. A Raman spectroscopic comparison of calcite and dolomite. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.**, v. 117, p. 158-162, 2014.
- 74PENEL, G. et al. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. **Calcif Tissue Int.**, v. 63, p. 475–481, 1998.
- 75AWONUSI, A., Morris, M. D., Tecklenburg, M. M. J. Carbonate assignment and calibration in the Raman spectrum of apatite. **Calcif Tissue Int.**, v.81, n.1, p. 46-52, 2007.
- 76MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- 77ALBERS, C.E. et al In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles on osteoblasts and osteoclasts at antibacterial concentrations. **Nanotoxicology**, v. 17, p. 30-36, 2013.
- 78GANDOLFI, M.G. et al. Biomimetic calcium-silicate cements aged in simulated body solutions. Osteoblast response and analyses of apatite coating. **J Appl Biomater Biomech.**, v. 7, p. 160-170, 2009.
- 79SAHA, N.; DUBEY, A.K.; BASU, B. Cellular proliferation, cellular viability, and biocompatibility of HA-ZnO composites. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 100, p. 256-264, 2012.

- 80MAGNUSSON, P. et al. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. **J Bone Miner Res.**, v. 14, p. 1926-33, 1999.
- 81TAGGER, M.; TAGGER, E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26 in monkeys. **Endod Dent Traumatol.**, v. 5, p. 139-46, 1989.
- 82LIU, J. et al. In vitro differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.**, v. 41, p. 232-8, 2005.
- 83AZARI, F. et al. Intracellular precipitation of hydroxyapatite mineral and implications for pathologic calcification. **J Struct Biol.**, v. 162, n. 3, p. 468-479, 2008.
- 84JONES, N.; RAY, B.; RANJIT, K.T.; MANNA, A.C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. **FEMS Microbiol Lett**, v. 279, p. 71-76, 2008.
- 85LIU, Y.; HE, L.; MUSTAPHA, A.; LI, H.; ZQ, H.; LIN, M. Antibacterial Activities of Zinc Oxide Nanoparticles Against Escherichia Coli O157:H7. **J. Appl. Microbiol**, v.107, p. 1193-201, 2009.
- 86HUANG, Z.; ZHENG, X.; YAN, D.; et al. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. **Langmuir**, v.24, p. 4140-4144, 2008.
- 87KISHEN, A. et al. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. **J. Endod.**, v. 34, p. 1515-1520, 2008.
- 88CHEN. X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoproduct in medical application. **Toxicol Lett.**, v. 176, p. 1-12, 2008.