

CLÁUDIA REGINA APPIO DUARTE

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE
COMPOSIÇÕES DE FOSFATO DE CÁLCIO PARA USO EM
REPARAÇÃO ÓSSEA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências
Agroveterinárias da Universidade do Estado de
Santa Catarina, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa

**LAGES
2015**

Duarte, Cláudia Regina Appio

Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de composições de fosfato de cálcio para uso em reparação óssea / Cláudia Regina Appio Duarte - Lages, 2015.

68 p.: il.; 21 cm

Orientador: Ubirajara Maciel da Costa

Inclui bibliografia.

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

1. Biomaterial. 2. Cerâmicas de fosfato de cálcio. 3. Fibroblastos. 4. Biocompatibilidade. 5. Cultivo Celular. I. Duarte, Cláudia Regina Appio. II. Costa, Ubirajara Maciel da. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno.

CLÁUDIA REGINA APPIO DUARTE

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE
COMPOSIÇÕES DE FOSFATO DE CÁLCIO PARA USO EM
REPARAÇÃO ÓSSEA**

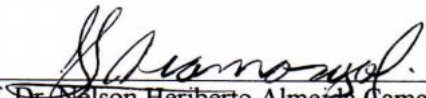
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador: _____

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Universidade do Estado de Santa Catarina - CAV- UDESC

Membro: _____


Prof. Dr. Nelson Heriberto Almeida Camargo
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro: _____


Prof. Dra. Sônia de Avila Botton
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Lages, 20/07/2015.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida abençoada e oportunidades que me deu. Agradecer também meus amados pais, Margarida Appio Duarte e Rui Cândido Duarte, meu irmão Rui Paulo Appio Duarte, pelo apoio incondicional e amor infinito. Ao meu amado namorado Fábio Cervo Garagorry que sempre esteve ao meu lado, me incentivando a buscar melhores caminhos.

Ao meu orientador Dr. Ubirajara Maciel da Costa, ou melhor, Bira, por sua amizade e ajuda em todas as horas, pelos conhecimentos repassados, pela paciência, pelas brincadeiras. Às professoras do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA), Sandra Maria Ferraz e Eliana Knackfuss Vaz, que sempre estavam dispostas a ajudar quando solicitadas. Enfim, agradeço a todos os bolsistas e estagiários da virologia do CEDIMA, em especial Raquel Silva Alves, Fernanda Boldo e Igor Augusto Coelho.

Às minhas amigas e colegas de mestrado/doutorado Flavia Harumi Scheffer Yamakawa, Caroline Martini, Paula Wildemann, Fernanda Daniele Melo, Monica Urío, Leíse Herrmann Parizotto, Cláudia Pies Biffi, Camila Lench, pelas risadas, estudos e amizade de vocês. Ao amigo Elvis Ticiani pelo apoio estatístico e pela sua prontidão em ajudar.

Ao professor Dr. Nelson Heriberto Almeida Camargo por todo o apoio fornecido neste período, auxiliando muito no entendimento desta nova e interessante área dos biomateriais. À doutoranda Daiara Floriano da Silva, que prontamente me auxiliou quando necessário. Espero que possamos continuar nesta parceria.

RESUMO

DUARTE, Cláudia Regina Appio. **Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de composições de fosfato de cálcio para uso em reparação óssea.** 2015. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Saúde Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

As biocerâmicas nanoestruturadas de fosfato de cálcio tem se destacado na área de biomateriais de reconstituição óssea pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto humano, reforçando sua importância na ortopedia, odontologia, fixação de implantes e reparação do tecido ósseo. Estes biomateriais apresentam micro e nanoestruturas microporosas interconectadas, formada por finos grãos e microporos, características estas que favorecem seu uso como matriz sintética na recuperação de tecido ósseo lesado. O cultivo de células *in vitro* é uma valiosa ferramenta para se estudar os mecanismos pelos quais os biomateriais podem produzir reações adversas em nível celular, indicando seu potencial para uso na prática médica. Este trabalho teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade das cerâmicas porosas de fosfato de cálcio em condições diferenciadas de morfologia de grãos e de microporos por meio do teste de citotoxicidade MTT, análise da curva de crescimento celular e estudo da interação célula-material por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise da interação célula-material por MEV mostrou a adesão e proliferação dos fibroblastos na superfície das diferentes biocerâmicas de fosfato de cálcio testadas. Nos resultados obtidos por meio do ensaio colorimétrico MTT e curva de crescimento constatou-se que os biomateriais testados se mostraram biocompatíveis, possuindo

grande potencial como substitutos ósseos. O biomaterial composto por 80% TCP- β /20% HA (1,67M/1100 °C/2h) apresentou viabilidade celular abaixo de 70% e curva de crescimento descendente, demonstrando grau de citotoxicidade.

Palavras-chave: Biomaterial. Cerâmicas de fosfato de cálcio. Fibroblastos. Biocompatibilidade. Cultivo Celular.

ABSTRACT

DUARTE, Cláudia Regina Appio. ***In vitro* evaluation of cytotoxicity of calcium phosphate ceramics for bone repair.** 2015. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Zootecnia) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

The nanostructured calcium phosphate bioceramics have shown importance in bone repair biomaterials for its chemical and crystallographic similarity with bone tissue crystalline structure, increasing their relevance in orthopedics, dentistry and bone healing. These biomaterials have interconnected microporous nanostructure, made of thin grains and micropores, which favor their use as synthetic matrix in recuperation of injure bone. *In vitro* cell culture is a value tool for studying the mechanisms whereby biomaterials can cause adverse reactions in cell level, indicating their potential use at medical practice. The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of porous calcium phosphate bioceramics with different morphology of grains and microporous by MTT assay, cell growth curve and cell-material interaction study by scanning electron microscope (SEM). The cell-material interaction study by SEM showed fibroblasts adhesion and proliferation in the biomaterials surface. In the results of MTT assay and cell growth curve it was found that the tested biomaterials were biocompatible, making them suitable candidates as bone substitutes. The biomaterial composed by 80% TCP- β /20% HA (1,67M/1100 °C/2h) showed cell viability less than 70% and descendant growth curve, indicating certain level of cytotoxicity.

Key-words: Biomaterial. Calcium phosphate ceramics.
Fibroblasts. Biocompatibility. Cell Culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Biomaterial no formato de bloco cilíndrico...	37
Figura 2	Placa de 24 poços com cilindros de biomaterial e DMEM.....	39
Figura 3	Leitor de ELISA Biotek® ELX808.....	43
Figura 4	Tapete celular de fibroblastos utilizados no trabalho com 100 % de confluência.....	44
Gráfico 1	Curva de crescimento celular dos fibroblastos após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 1 em diferentes tempos.....	45
Gráfico 2	Curva de crescimento celular dos fibroblastos após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 2 em diferentes tempos.....	47
Gráfico 3	Viabilidade celular (%) medida pelo teste MTT após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 1 em 24, 48 e 72 h.....	48
Gráfico 4	Viabilidade celular (%) medida pelo teste MTT após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 2 em 24, 48 e 72 h.....	50
Figura 5	Microscopia Eletrônica de Varredura do biomaterial 5 (1,7M/1200 °C; TCP-β/TCP-α/HA). A) Micrografia mostrando a superfície de fratura do biomaterial. B) Fibroblasto aderido ao biomaterial 5 em contato por 24h.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupo 1 de biomateriais utilizados no experimento de acordo com a razão Ca/P, composição e temperatura de sinterização.....	36
Tabela 2	Grupo 2 de biomateriais utilizados no experimento de acordo com a razão Ca/P, composição e temperatura de sinterização.....	37
Tabela 3	Quantidade de células após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 1 em diferentes tempos.....	45
Tabela 4	Quantidade de células após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 2 em diferentes tempos.....	46
Tabela 5	Viabilidade celular (%) medida pelo teste MTT após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 1 em 24, 48 e 72 h.....	48
Tabela 6	Viabilidade celular (%) medida pelo teste MTT após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 2 em 24, 48 e 72 h.....	49

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
Ca ²⁺	Íon cálcio
CCT	Centro de Ciências Tecnológicas
CEDIMA	Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramas
h	Horas
HA	Hidroxiapatita
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
M	Molar
mM	Milimolar
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
OD	Densidade óptica
O ₂	Oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico
PO ₄ ³⁻	Íon fosfato
SAS	Statistical Analysis System
SFB	Soro fetal bovino
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
α-TCP	Trifosfato de cálcio alfa
β-TCP	Trifosfato de cálcio beta
μL	Microlitro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	CULTURA DE CÉLULAS.....	24
2.1.1	Fibroblastos.....	26
2.2	TECIDO ÓSSEO.....	26
2.3	BIOMATERIAIS.....	27
2.3.1	Biocerâmicas de fosfato de cálcio de origem natural.....	28
2.4	ENSAIO <i>IN VITRO</i> : CITOTOXICIDADE.....	33
2.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	OBTENÇÃO DAS BIOCERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO.....	36
3.2	PREPARO DE MEIOS PARA CULTIVO CELULAR.....	37
3.3	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS.....	38
3.4	DESCONGELAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS.....	38
3.5	PREPARO DO EXTRATO DOS BIOMATERIAIS	39
3.6	EMPLACAMENTO DAS CÉLULAS COM OS CILINDROS DE BIOMATERIAL.....	40
3.7	DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO CÉLULA-MATERIAL POR MEV.....	40
3.8	DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR.....	40
3.9	DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS BIOMATERIAIS PELO TESTE MTT.....	41
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43

	RESULTADOS.....	44
4.1	CULTIVO CELULAR.....	44
4.2	CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR.....	44
4.3	VIABILIDADE CELULAR.....	47
4.4	INTERAÇÃO CÉLULA-MATERIAL.....	50
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A procura por uma melhor qualidade de vida da população, juntamente com o aumento da expectativa de vida, provocaram significativos avanços nas pesquisas e produção de biomateriais de substituição e restauração de tecido ósseo. Pois com o envelhecimento do organismo ocorre a diminuição da resistência dos ossos e o aumento da probabilidade de fratura e perda óssea (DOROZHKIN, 2007).

O tecido ósseo apresenta grande poder de regeneração, mas em situações em que a lesão possui grande extensão, a resposta do organismo é insuficiente para uma reparação completa do tecido, sendo necessário o uso métodos e materiais alternativos na tentativa de estimular a osteogênese. Um dos métodos biológicos mais utilizados é o autoenxerto, que é obtido de outro local saudável no mesmo indivíduo. Já os aloenxertos são retirados de um indivíduo diferente, porém, da mesma espécie que o receptor (KAMITAKAHARA, *et al.*, 2008).

Porém, a aplicação destes enxertos é limitada ao estado do paciente e à localização e tamanho do defeito ósseo. A utilização desse tipo de implante apresenta numerosas desvantagens, como complicações pós-operatórias, aumento do tempo de operação e, em alguns casos, a indisponibilidade da quantidade de osso necessária para restaurar o defeito ósseo (CONSTANTINO *et al.*, 1991). Uma alternativa ao uso destes enxertos é o uso de biomateriais, que tem sido um importante foco de pesquisas nas áreas biomédicas e de engenharia.

As biocerâmicas nanoestruturadas de fosfato de cálcio tem se destacado na área de biomateriais de reconstituição óssea pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto humano, reforçando sua importância na ortopedia, odontologia, fixação de implantes e reparação do

tecido ósseo (CAMARGO, 2007). Além de apresentarem excelente biocompatibilidade, não provocam toxicidade local ou sistêmica, integram-se com o tecido ósseo sem formação de cápsula fibrosa e não afetam o processo normal de mineralização.

Para serem utilizados na prática médica, os biomateriais precisam atender alguns requisitos básicos como: biocompatibilidade, biofuncionalidade e capacidade de induzir a formação de um novo tecido no indivíduo (GINEBRA *et al.*, 1996). O primeiro nível de teste, dentro da avaliação de biocompatibilidade de um biomaterial é a determinação da citotoxicidade *in vitro* (ISO 10993-5, 1992). Em comparação com as investigações *in vivo*, os estudos *in vitro* são mais facilmente controlados e apresentam melhor reprodutibilidade, além de diminuir o uso de animais em testes (FRESHNEY, 2000). O cultivo de células *in vitro* é uma valiosa técnica para se estudar os mecanismos pelos quais biomateriais podem ou não produzir reações adversas em nível celular (WENNBERG *et al.*, 1979).

Um dos testes mais utilizados para avaliação da citotoxicidade *in vitro* é o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que avalia a atividade mitocondrial, onde somente células viáveis conseguem converter o sal amarelo MTT em cristais de formazan, de cor púrpura. Essa produção de formazan é então quantificada através da leitura da densidade óptica das amostras.

Segundo Fricain *et al.* (2002) a proliferação celular obtida pela contagem do número de células e curva de crescimento também pode ser utilizada como parâmetro para avaliação de citotoxicidade.

Os estudos da interação célula-material são também de grande importância para avaliar adesão e proliferação das células sobre o material, o que está diretamente relacionado com a citocompatibilidade do mesmo.

Com interesse de dispor de substitutos ósseos com melhor segurança para testes *in vivo* e posterior aplicação em humanos, este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos biomateriais de fosfato de cálcio em condições diferenciadas de morfologia de grãos e de microporos sobre cultura de fibroblastos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DE CÉLULAS

A cultura de tecidos *in vitro* teve seus primeiros experimentos realizados há cerca de 100 anos por Harrison e Carrel com o estudo do comportamento de células animais sem as interferências sistêmicas. Harrison, em 1907, mostrou que fibras nervosas podem ser mantidas vivas em uma solução salina, fora do organismo do animal (NICHOLAS, 1961). Carrel, em 1912, demonstrou que as células de embriões de galinha podem crescer por longos períodos em cultura, desde que sejam alimentadas regularmente, sob condições assépticas (WITKOWSKY, 1980).

Em 1952 Gey e colegas estabeleceram uma linhagem contínua de células derivadas de carcinoma cervical humano, largamente utilizada em pesquisas médicas, que ficou conhecida como células HeLa (SNYDER, 2005). O meio utilizado era extremamente complexo e pouco definido: plasma de galinha, extrato de embrião de bovino e soro de cordão umbilical humano. O primeiro meio de cultura definido para células animais foi descrito por Harry Eagle, em 1955, e continha 27 componentes (13 aminoácidos, 7 vitaminas, glicose e 6 sais). Neste meio era adicionado soro humano ou bovino, que servem como fonte de fatores de crescimento, necessários para estimular a divisão celular (LYNCH, 2008).

A cultura de células refere-se a células isoladas do tecido original ou de linhagem celular, obtidas por desagregação enzimática, mecânica ou química (SLOCUM, 1981). Uma grande variedade de células animais pode ser cultivada e manipulada *in vitro*. Os fibroblastos são um dos

tipos celulares animais mais utilizados devido à facilidade de isolamento e cultivo (RAAB *et al.*, 2014).

A maioria dos cultivos celulares necessita de suplementação de soro em seu meio de cultura, sendo que o mais utilizado é o soro fetal bovino (SFB). Ele fornece várias macromoléculas, proteínas carreadoras, fatores de adesão e proliferação celular, aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, hormônios e fatores de crescimento. Devido às preocupações científicas e éticas, estudos vem buscando substituir o SFB por outros suplementos ou pelo uso de componentes químicos definidos adicionados em meios de cultivo celular livres de soro (GSTRAUNTHALER, 2003).

O ciclo de crescimento de células em cultura é dividido em três fases: (a) Fase *Lag*, nesta fase ocorre pequeno aumento no número de células. É uma fase de adaptação na qual as células repõem elementos de superfície e da matriz extracelular. Também ocorre produção de DNA polimerase, seguido de síntese de DNA e proteínas estruturais. (b) Fase *Log*, esta fase é o período de crescimento exponencial do número de células, formando camadas celulares confluentes. (c) Fase *Plateau*, nesta fase toda a superfície de crescimento da placa está ocupada e todas as células estão em contato com as células ao redor. A cultura entra em fase estacionária com diminuição da atividade mitótica. Esta redução da multiplicação celular se dá pelo contato célula-célula, falta de nutrientes e fatores de crescimento e reduzida capacidade de dispersão celular (FRESHNEY, 2000; HAYFLICK & MOORHEAD, 1961).

Células diploides ($2n$) normais apresentam um potencial limitado de divisões em cultura, um evento chamado de senescência celular (HAYFLICK & MOORHEAD, 1961). Em células somáticas humanas sabe-se que o comprimento ou integridade dos telômeros refletem a capacidade mitótica *in vitro*. Os telômeros previnem a degradação e a fusão dos cromossomos. Ocorre um encurtamento de cinquenta a

duzentos pares de bases no DNA telomérico a cada ciclo de replicação do DNA. Quando o DNA do telômero atinge um comprimento médio de quatro a sete mil pares de bases, a divisão celular é suspensa irreversivelmente em células somáticas humanas normais (HARLEY *et al.*, 1990). Em células tumorais o comprimento do telômero é mantido pela telomerase, que é capaz de replicar sequências terminais dos telômeros (KIM *et al.*, 1994).

O aprimoramento do cultivo celular ocorreu devido a dois fatores principais: a produção de vacinas antivirais e o estudo de neoplasias. Outro grande estimulador do avanço nas pesquisas relacionadas à cultura celular foi a preocupação em substituir ao máximo o uso de animais em experimentos pelos testes *in vitro* (FRESHNEY, 2000).

2.1.1 FIBROBLASTOS

Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo e originam-se a partir de uma célula mesenquimal indiferenciada, estão embebidos em uma matriz extracelular secretada por eles. Estas células são fundamentais para a deposição, remodelação e organização da matriz extracelular, especialmente durante o processo de cicatrização de feridas (HINZ *et al.*, 2007). Dentre os componentes da matriz secretados pelos fibroblastos estão o colágeno, glicosaminoglicanos e fibronectina (BAXTER, 2002).

Em cultura, as células fibroblásticas apresentam-se alongadas e com longos prolongamentos. Estas células são obtidas a partir de tecido conjuntivo, cartilagens, revestimentos de vasos sanguíneos, músculos e estromas de vários órgãos.

2.2 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o componente principal do esqueleto, serve de suporte para os tecidos moles e protege órgãos vitais.

Aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue e proporciona apoio aos músculos esqueléticos. Além dessas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

O tecido ósseo apresenta grande poder de regeneração, mas em situações em que se tem lesões de grande extensão, decorrentes principalmente de acidentes, infecções, tumores e defeitos congênitos, a resposta do organismo é insuficiente para uma reparação completa do tecido, sendo necessário o uso de enxertos. Autoenxertos são obtidos de outro local saudável no mesmo indivíduo. Os aloenxertos são retirados de um indivíduo diferente, porém, da mesma espécie que o receptor. Já no xenoenxerto o tecido a ser implantado é retirado de um indivíduo diferente e de espécie diferente que o receptor (KAMITAKAHARA *et al.*, 2008).

O sucesso destes enxertos é limitado por problemas relacionados à disponibilidade do enxerto, morbidade, imunogenicidade e integridade biomecânica. Diante destas limitações, o desenvolvimento e o uso de materiais substitutos ósseos é uma alternativa importante aos enxertos ósseos. (KOLK, 2012).

2.3 BIOMATERIAIS

O início da utilização de biomateriais ocorreu há dois mil anos pelos romanos, chineses e astecas, que usavam o ouro como um implante dentário primitivo. O período da segunda guerra mundial foi determinante para o desenvolvimento dos biomateriais, devido à necessidade de tratar as sequelas físicas decorrentes de acidentes e desastres (RATNER *et al.*, 1996).

Para Yuan *et al.* (2006) um dos principais objetivos da ciência dos biomateriais é desenvolver materiais que tenham a

capacidade de reparar, aumentar ou substituir tecidos ou órgãos quando necessário. Os biomateriais disponíveis no mercado estão continuamente sendo estudados e otimizados no que diz respeito as suas propriedades químicas, mecânicas e de arquitetura, buscando mimetizar as características ósseas do esqueleto.

Entende-se por biomaterial, toda substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que não sejam drogas ou fármacos, e que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, podendo aumentar ou substituir quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo de modo a melhorar a qualidade de vida do indivíduo (WILLIAMS, 1987).

Com o surgimento da nanotecnologia os biomateriais evoluíram de forma a alcançar a menor unidade atômica. O princípio básico da nanotecnologia é a construção de estruturas e novos materiais a partir dos átomos. Um nanômetro (nm) equivale a um bilionésimo de metro, enquanto que um micrômetro (μm) é definido como um milionésimo de metro (SILVA, *et al.*, 2012).

Para serem utilizados na prática médica, os biomateriais precisam atender alguns requisitos básicos como: biocompatibilidade, biofuncionalidade, pH próximo ao neutro, ausência de efeitos exotérmicos, ausência de toxicidade, propriedades mecânicas adequadas pós-implantação e capacidade de induzir a formação de novo tecido (GINEBRA *et al.*, 1996). Biocompatibilidade se refere à habilidade do biomaterial em desempenhar sua função na terapia médica, sem provocar efeitos locais ou teciduais indesejáveis no indivíduo, mas gerando a resposta celular ou tecidual mais apropriada para a situação (WILLIAMS, 2008).

2.3.1 BIOCERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO DE ORIGEM NATURAL

Durante as últimas décadas, houve avanços no desenvolvimento de materiais biomédicos, incluindo materiais cerâmicos para reparo e reconstrução do esqueleto. Os materiais desta classe de implantes médicos são chamados de biocerâmicas e sua aplicação na medicina tem se expandido juntamente com o aumento do número de publicações e patentes e a realização de conferências relacionadas ao tema (DOROZHKIN, 2010). O grande número de acidentes de trânsito com lesões graves, além do aumento na expectativa de vida e responsabilidade social em oferecer uma melhor qualidade de vida foram fatores cruciais para este avanço nas pesquisas (DOROZHKIN, 2007).

As biocerâmicas são materiais inorgânicos classificados de acordo com as fases presentes em suas composições: (a) monolíticos, formados por uma única composição química; (b) compósitos que são constituídos por dois ou mais constituintes químicos distintos dentro de uma matriz cerâmica (BELLINI, 2007).

As biocerâmicas de fosfatos de cálcio se destacam como biomateriais de aplicação clínica devido à sua excelente biocompatibilidade e não toxicidade de seus componentes químicos, além de apresentar capacidade de osteocondução e osteoindução em algumas espécies animais, que já foi aceita e confirmada por vários pesquisadores (KUMTA, 2005; WANG et al, 2014; YUAN *et al*, 2006). 1) Osteoindução é a propriedade de formação de novo osso pelas células osteoprogenitoras do leito receptor sob a influência de um agente indutor do material implantado. 2) Osteocondução é a propriedade de formação de novo tecido ósseo por proliferação e migração de células ósseas do leito receptor através da superfície do material implantado, que serve como arcabouço (GAO *et al.*, 2006). Segundo LeGeros *et al.* (2008) as propriedades osteoindutivas de um material são normalmente demonstradas pela formação óssea pós-implante em locais do

organismo que não possuem tecido ósseo (exemplo: tecido subcutâneo ou muscular).

Essa classe de biomateriais destaca-se também pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto humano, reforçando sua importância na ortopedia, odontologia, fixação de implantes e reparação do tecido ósseo (CAMARGO, 2014; YUASA, 2004).

As biocerâmicas de fosfato de cálcio produzidas a partir de matérias primas naturais se classificam principalmente nas composições hidroxiapatita e trifosfato de cálcio. O fosfato tricálcico apresenta três polimorfos conhecidos: TCP- β , TCP- α e TCP- α' (ELLIOT, 1994). O β -TCP é a fase estável à temperatura ambiente e pode ser transformada em TCP- α a 1125 °C. Ambos são utilizados em diversas aplicações clínicas, sendo que a fase beta é usada na composição de várias cerâmicas monofásicas ou bifásicas e compósitos comerciais, enquanto que a fase alfa é o principal constituinte do componente sólido dos cimentos hidráulicos ósseos. (DOROZHKIN, 2010).

Dentre as matérias primas naturais utilizadas para elaboração destas composições se encontra o osso bovino liofilizado, corais, algas, conchas calcárias. Uma desvantagem do osso bovino é o fato de ser um material xenógeno (origem de outro indivíduo e de espécie diferente) que pode desencadear reações imunológicas e inflamatórias no hospedeiro (ALMEIDA, 2010; SIQUEIRA, 2009).

Pesquisas são realizadas de modo a buscar fontes alternativas no desenvolvimento de biomateriais para uso em reparação óssea. Destaca-se a utilização de matérias primas de origem calcária como os corais marinhos, conchas calcárias fossilizadas, ouriços do mar, cascas de ostras, cascas de ovos e ossos corticais bovinos. (MENDES *et al.*, 2006; SILVA, 2015; TANUR, 2010).

De acordo com Demers *et al.* (2001) os primeiros estudos com o uso de corais como substitutos ósseos foram

realizados na década de 70 quando pesquisadores começaram a desenvolver biomateriais porosos. Nos Estados Unidos pesquisadores realizaram testes *in vitro*, utilizando biomateriais obtidos de corais marinhos, na forma de particulado, para aplicações no reparo de defeitos e reconstituição do tecido ósseo. O citoesqueleto destes animais é formado por carbonato de cálcio e mostrou-se biocompatível, osteocondutivo e biodegradável quando implantado (DEMERS *et al.*, 2001).

Biocimentos nanoestruturados formados por fosfato de cálcio podem ser utilizados em cirurgias maxilo-faciais, fixação de implantes, reconstrução de tecido ósseo e eliminação de defeitos ósseos. Estes materiais apresentam grande superfície de área, favorecendo a dissolução da cerâmica e precipitação da apatita biológica, adsorção de proteínas e fatores de crescimento, assim como a adesão e colonização pelas células osteoprogenitoras (CAMARGO, 2007; FELLAH *et al.*, 2008). Quando aplicados biologicamente, apresentam rápida biodegradação, biorreabsorção óssea, iniciando a formação de novo tecido ósseo em aproximadamente 30 a 60 minutos após o contato com o fluido corpóreo (WANG, 2001).

Vários estudos na área de biomateriais tem se voltado à obtenção de biomateriais nanoestruturados, principalmente os trabalhos relacionados à síntese de pós biocerâmicos nanoestruturados de fosfato de cálcio e hidroxiapatita, devido a estas biocerâmicas apresentarem comportamento de biodegradação favorecendo a formação do tecido ósseo (DOS SANTOS, 2009).

As biocerâmicas microporosas se destacam por apresentarem uma arquitetura e constituição mineralógica semelhante a da estrutura óssea (DOS SANTOS, 2009). Este material microporoso apresenta como vantagem ser inerte, além de possuir estabilidade mecânica na interface, desenvolvida quando o osso cresce dentro dos poros da cerâmica. Quando os poros do biomaterial excedem 100µm, o

tecido ósseo se prolifera dentro dos canais interconectados dos poros, mantendo sua vascularidade e viabilidade. O comportamento mecânico dos fosfatos de cálcio influencia fortemente sua aplicação em implantes. A tensão de compressão e resistência à fadiga dos biomateriais microporosos dependem do volume total de poros do biomaterial (HENCH, 1991).

A importância da microestrutura e do volume de poros fosfatos de cálcio tem sido reportada em diversas pesquisas, onde afirmam que controlando as microestruturas das cerâmicas de fosfatos de cálcio, pode-se desenvolver substitutos ósseos com propriedades osteoindutivas intrínsecas. Esta microporosidade das cerâmicas de fosfato de cálcio permite a adesão das células relacionadas ao reparo ósseo, afetando sua atividade e subsequente substituição óssea. (KAMITAKAHARA *et al.*, 2008).

Fellah *et al.* (2008) afirma que cerâmicas porosas osteocondutivas compostas de hidroxiapatita e trifosfato de cálcio- β (TCP- β), sem adição de nenhum fator de crescimento ou células, podem ser utilizados para tratar grandes defeitos ósseos com uma eficiência comparável aos enxertos ósseos autólogos, o que confirma seu grande potencial clínico.

Durante muitos anos a hidroxiapatita foi a cerâmica de fosfato de cálcio mais utilizada para reposição de tecido ósseo, devido as suas similaridades químicas com os componentes inorgânicos do esqueleto humano (BEST *et al.*, 2008). Porém, a hidroxiapatita apresenta uma taxa de solubilidade menor que a do TCP- β . Esta taxa está relacionada com a absorção que o biomaterial sofrerá quando este estiver em contato com os fluidos corpóreos, influenciando na osteoindução, osteointegração e na reparação da estrutura óssea (DI SILVIO, 2009). Por outro lado, o TCP- β apresenta rápida liberação de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} quando exposto aos fluidos fisiológicos, sendo considerado bioativo. Estudos mostram que com a mistura apropriada das duas fases pode-se obter melhores

resultados (SANCHÉZ-SALCEDO *et al.*, 2009). Biocerâmicas bifásicas compostas de hidroxiapatita e TCP- β têm sido desenvolvidas, e observa-se que apresentam absorção mais rápida em relação aos fosfatos de cálcio puros, devido ao aumento da sua solubilidade (DACULSI, 1998).

2.4 ENSAIO *IN VITRO*: CITOTOXICIDADE

Avaliações biológicas de materiais para uso médico são realizadas de modo a determinar a toxicidade resultante do contato dos componentes do material com o organismo. Os materiais testados não podem produzir efeitos adversos locais ou sistêmicos, ser carcinogênico, ou produzir efeitos no desenvolvimento. Quando se escolhe um teste para avaliação biológica deve-se levar em consideração as características químicas do material a ser testado, assim como a frequência e exposição no organismo receptor. Um dos principais testes de biocompatibilidade de biomateriais é a determinação da citotoxicidade *in vitro* (ISO 10993-5, 1992).

Em comparação com testes *in vivo*, os estudos *in vitro* são mais facilmente controlados, financeiramente acessíveis e apresentam melhor reprodutibilidade. A realização de ensaios *in vitro* ainda permite redução no número de animais utilizados na avaliação da biocompatibilidade de um material (FRESHNEY, 2005).

O cultivo de células é uma ferramenta valiosa para se conhecer os mecanismos pelos quais biomateriais podem produzir reações adversas em nível celular. Assim, lise celular, mudanças no crescimento e na permeabilidade da membrana celular podem ser verificadas *in vitro*, revelando efeitos citotóxicos ocasionados pelos materiais testados (LYGRE *et al.*, 1995). Testes *in vitro* também fornecem informações valiosas a respeito da morfologia, proliferação e adesão celular, comportamento das células simulando o microambiente celular e molecular da reparação, quando se faz o uso de biomateriais.

Vale ressaltar que a experimentação *in vitro* não substitui o subsequente estudo *in vivo*. Ambos são necessários para um adequado esquema de testes de potenciais biomateriais (KIRKPATRICK, 1990).

Avalia-se normalmente a citotoxicidade basal, ou seja, aquela que inibe as estruturas e funções comuns a todas as células do organismo, tais como a membrana celular, mitocôndria, ribossomos, cromossomos e lisossomos. Alterações nas funções basais geralmente afetam as específicas. Os tempos de exposição celular aos materiais testados podem ser de curta duração (períodos de até 4 horas) ou de longa duração (períodos de 24 horas ou mais) (BARILE, 1994).

A avaliação de citotoxicidade pode ser feita através de testes qualitativos, onde se avalia a morfologia das células; ou quantitativos, que se caracterizam pela quantificação do número de células e atividade celular após a exposição ao agente testado (ISO 10993-5, 1992).

Segundo a ISO 10993-5 (1992) três diferentes métodos de cultura podem ser feitos para avaliar a citotoxicidade de um biomaterial: contato direto, no qual o material fica em contato direto com as células; contato indireto, no qual o material fica sobre camada de ágar que está sobre as células e os possíveis produtos tóxicos podem se difundir no ágar; e teste por extração, que utiliza um solvente (meio de cultura) em contato com o material por um determinado período de tempo, liberando produtos de sua decomposição no meio, para posterior contato com as células e assim avaliar sua toxicidade.

Tim Mosmann (1983) desenvolveu um teste colorimétrico quantitativo de avaliação da viabilidade celular chamado MTT, sendo um dos principais testes de citotoxicidade utilizados atualmente em pesquisas. Esse teste se baseia no uso do sal brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para avaliar a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. A redução do MTT,

de cor amarelada, a um produto insolúvel de cor púrpura, decorrente da formação de cristais de formazan ocorre apenas em células viáveis (mitocôndrias ativas), refletindo o estado funcional da cadeia respiratória celular. A quantidade de cristais de formazan formados e consequente intensidade da coloração púrpura são diretamente proporcionais ao número de células viáveis presentes. A densidade óptica (OD) resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A avaliação da adesão e proliferação celular sobre o material também é de grande importância para verificar a biocompatibilidade. Ela pode ser feita através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), permitindo observar a interação das células com o material avaliado (MARQUES, *et al.*, 2002).

O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas. O MEV apresenta as imagens da amostra de maneira tridimensional devido à grande profundidade de campo, fornecendo informações sobre a morfologia de amostras sólidas, tornando-se um importante complemento às informações obtidas com a microscopia óptica (DEDAVID *et al.*, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS BIOCERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO

Os biomateriais utilizados no presente trabalho foram fornecidos pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CTT – Joinville. Os biomateriais foram divididos em dois grupos conforme sua temperatura de sinterização: grupo 1 (1-5), correspondente aos materiais sinterizados a 1200 °C (Tabela 1); e grupo 2 (6-10), materiais sinterizados a 1100 °C (Tabela 2). A obtenção de pós de fosfato de cálcio se deu pelo método de síntese via úmida, a partir do precursor carbonato de cálcio (CaCO₃), proveniente de conchas calcárias fossilizadas e ácido fosfórico.

Tabela 1 - Grupo 1: biomateriais utilizados no experimento de acordo com a razão Ca/P, composição e temperatura de sinterização.

Biomaterial	Descrição	Composição
1	1,4M 1200 °C/2h	TCP-β
2	1,5M 1200 °C/2h	TCP-β
3	1,6M 1200 °C/2h	TCP-β
4	1,67M 1200 °C/2h	80% TCP-β e TCP-α / 20% HA
5	1,7M 1200 °C/2h	70% TCP-β e TCP-α / 30% HA

Legenda: TCP-β- trifosfato de cálcio beta; TCP-α- trifosfato de cálcio alfa; HA- hidroxiapatita.

Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais UDESC/CCT.

Tabela 2 - Grupo 2 de biomateriais utilizados no experimento de acordo com a razão Ca/P, composição e temperatura de sinterização.

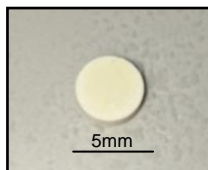
Biomaterial	Descrição	Composição
6	1,4M 1100 °C/2h	TCP-β
7	1,5M 1100°C/2h	TCP-β
8	1,6M 1100 °C/2h	TCP-β
9	1,67M 1100 °C/2h	80% TCP-β / 20% HA
10	1,7M 1100 °C/2h	70% TCP-β / 30% HA

Legenda: TCP-β- trifosfato de cálcio beta; TCP-α- trifosfato de cálcio alfa; HA- hidroxiapatita

Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais UDESC/CCT.

Os biomateriais se apresentavam sob a forma de blocos cilíndricos microporosos de 5mm x1,2mm (Figura 1).

Figura 1 - Biomaterial no formato de bloco cilíndrico



Fonte: DUARTE, 2015.

3.2 PREPARO DE MEIOS PARA CULTIVO CELULAR

O meio utilizado para o cultivo e manipulação das células foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) High glucose D1152 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO,

EUA), contendo 25 mM de HEPES e 4,5 g/L de glicose, adicionado de 26 mM de NaHCO₃, 0,2 mM de piruvato de sódio, 65 mg/L de penicilina sódica (Sigma-Aldrich Co.), 50 mg/L de sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich Co.), e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell®, Campinas, SP). Para a individualização das células foi usada solução isotônica de 0,05% de Tripsina 1:250 (BD Difco®, 215240, França) contendo 0,6 mM de EDTA.

Os meios e soluções utilizados no experimento foram preparados com água ultrapura tipo I (Direct-Q, Milli-Q). Após seu preparo, os meios eram filtrados utilizando-se um filtro descartável com membrana de 0,22 micrômetros e armazenados a 4 °C ou -20 °C até o momento de sua utilização.

3.3 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS

Para este experimento foram utilizadas linhagens celulares finitas de fibroblastos do banco de células do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do CAV- UDESC. Essas células foram obtidas através de explante após biópsia auricular de uma fêmea bovina da raça Flamenga, e criopreservadas com 10% de DMSO em criotubos em nitrogênio líquido a -196 °C (URIO, 2012).

3.4 DESCONGELAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS

Os criotubos contendo as células congeladas foram retirados do botijão de nitrogênio líquido e colocados em banho-maria a 37 °C por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo de fundo cônico com capacidade de 15 mL, o qual continha 2 mL de DMEM + 10% de SFB a 37 °C. O tubo foi centrifugado a 526 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi ressuspenso em 1 mL de DMEM + 10% de SFB

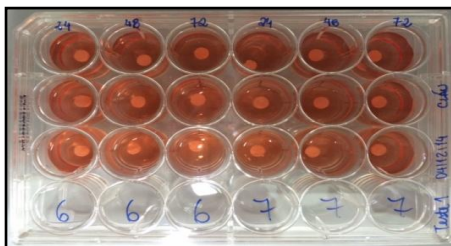
para a contagem celular pelo método de exclusão de células mortas por coloração com azul de Tripán a 0,4% (FRESHNEY, 2000).

Após a contagem e deposição de 5×10^5 células por placa de cultivo de 60 mm, as células eram cultivadas em DMEM acrescido de 10% de SFB, e mantidas na incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ em ar e atmosfera com umidade saturada, até atingirem a confluência máxima de 90%. Para os experimentos de viabilidade e proliferação celular, eram tripsinizadas e transferidas para placas de 24 poços.

3.5 PREPARO DO EXTRATO DOS BIOMATERIAIS

Para obtenção do extrato dos biomateriais foram utilizadas placas de 24 poços, com 1,9 cm² cada poço (TPP, Trasadingen, Suíça), onde se depositou 1 cilindro de biomaterial por poço, totalizando 9 cilindros de cada biomaterial (Figura 2). Foi adicionado 1,5 mL de meio de cultivo DMEM sem SFB por cima do biomaterial e colocado na incubadora a 37 °C por 4 dias. Após, foi retirado 1,5 mL do meio que ficou em contato com o biomaterial, formando o extrato de biomaterial, e armazenado em microtubos de 1,5 mL na geladeira a 4 °C até a sua utilização nos testes MTT e curva de crescimento.

Figura 2 - Placa de 24 poços com cilindros de biomaterial e DMEM.



Fonte: DUARTE, 2015.

3.6 EMPLACAMENTO DAS CÉLULAS COM OS CILINDROS DE BIOMATERIAL

Após a retirada do extrato de biomaterial de todos os poços, foi depositado por cima de cada cilindro, 1 mL de DMEM + 10% de SFB e adicionado 10.000 células por poço. As células juntamente com o cilindro de biomaterial ficaram em cultivo, nas condições já descritas, por 24, 48 e 72 horas. Nos intervalos determinados o meio de cultivo era descartado, e o tapete celular desidratado completamente em incubadora a 37 °C. Posteriormente à desidratação das células nas placas, estas foram encaminhadas ao Grupo de Pesquisas em Biomateriais da UDESC/CCT para análise microestrutural no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

3.7 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO CÉLULA-MATERIAL POR MEV

O estudo da caracterização morfológica e microestrutural dos fibroblastos com os cilindros de biomaterial foram realizados pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT – Joinville, através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o equipamento marca ZEISS modelo DSM 940A, por meio do método com elétrons secundários (SE), com distância de trabalho de 10mm e tensão de aceleração dos elétrons entre 15 kV.

3.8 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR

A curva de crescimento celular tem como objetivo avaliar a proliferação das células em determinado período de tempo. Para obtenção da curva as células foram depositadas na densidade de 1×10^4 células por poço em placas de 24 poços,

com 1,9 cm² cada poço (TPP, Trasadingen, Suíça). Os extratos dos 10 biomateriais foram testados em triplicata, assim como o grupo controle. Logo após a deposição das células foi acrescentado 1 mL do extrato de biomaterial acrescido de 10% de SFB, e no grupo controle foi utilizado 1 mL do meio DMEM + 10% de SFB. As leituras foram realizadas em triplicata, as 24 h, 48 h e 72 h pós-cultivo.

Para a realização da leitura retirou-se o extrato do biomaterial ou meio de cultivo dos poços e as células foram individualizadas com a adição de 500 µL de tripsina a 0,05%. Para a inativação da tripsina foi acrescentado 1 mL de meio DMEM + 10% de SFB e este volume transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado por 5 min a 419 g. Em seguida da centrifugação e formação do *pellet* de células, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 100 µL de meio de cultivo com 10% de SFB para ressuspensão das células. As células foram homogeneizadas e feita a determinação da concentração celular pelo método de azul de Tripán a 0,4%, sendo as leituras realizadas na câmara de Neubauer.

3.9 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS BIOMATERIAIS PELO TESTE MTT

Este ensaio é utilizado para estimar a citotoxicidade através da avaliação da atividade mitocondrial, onde somente células viáveis conseguem converter o sal amarelo MTT em cristais de formazan, de cor púrpura.

Para a realização deste teste foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Suíça), onde foram depositadas 1×10^4 células por poço. Cada poço continha 100 µL do extrato de biomaterial acrescido de 10% de SFB, e o grupo controle foi cultivado com 100 µL do meio DMEM + 10% de SFB. Também foi incluído um controle branco contendo apenas 100 µL de DMEM sem SFB.

O teste MTT foi realizado nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento, e foi utilizada uma placa para cada período de teste. Primeiramente foi retirado o meio de cultivo do grupo controle e o extrato do biomaterial dos demais poços, sendo substituídos por 100 μL de meio DMEM fresco, adicionados de 10 μL da solução 12mM de MTT e incubados a 37 °C por 4 horas. Após, foi removido 85 μL do volume de cada poço e adicionado 50 μL de DMSO (Dimethyl sulphoxide, Himedia, Índia) por poço, e incubados a 37 °C por 10 minutos. Homogeneizou-se cada poço e a placa foi colocada no agitador de placas por 5 minutos para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância das amostras foi feita utilizando um leitor de ELISA Biotek® ELX808 (Figura 3), com comprimento de onda de 490nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e a viabilidade celular relativa foi obtida através da equação abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade celular relativa: } (DO_a - DO_b)/(DO_{cp} - DO_b) \times 100$$

Sendo DO_a : densidade óptica da produção de formazan da amostra; DO_b : densidade óptica do branco (DMEM sem células); DO_{cp} : densidade óptica do controle positivo (células cultivadas com DMEM + 10% SFB).

Figura 3 - Leitor de ELISA Biotek® ELX808.



Fonte: DUARTE, 2015.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

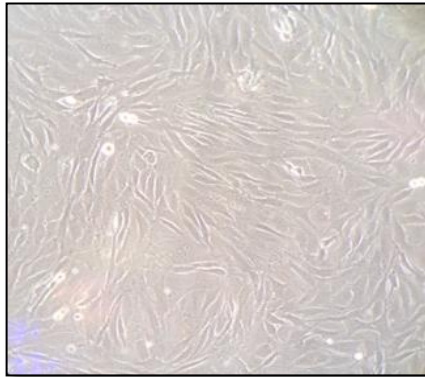
A análise estatística foi realizada pelo pacote estatístico SAS (SAS Institute, 2009), por meio do procedimento GLM, adotando-se um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 CULTIVO CELULAR

O cultivo celular de fibroblastos (Figura 4) mostrou-se viável e com bom aspecto de crescimento após ser descongelado. As células foram mantidas em cultivo, não ultrapassando-se 90% de confluência até sua utilização.

Figura 4 - Tapete celular de fibroblastos utilizados no trabalho com 100 % de confluência (aumento de 200X).



Fonte: DUARTE, 2015.

4.2 CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR

Quando avaliada a proliferação celular após contato com o grupo 1 de biomateriais, sinterizados a 1200 °C, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos e entre os tratamentos e as células controle no período de 24 h. Contudo, na avaliação em 48 h, o biomaterial 4 apresentou resultado significativamente melhor que o biomaterial 2 e também houve diferença significativa quando comparado ao controle, apresentando uma maior contagem

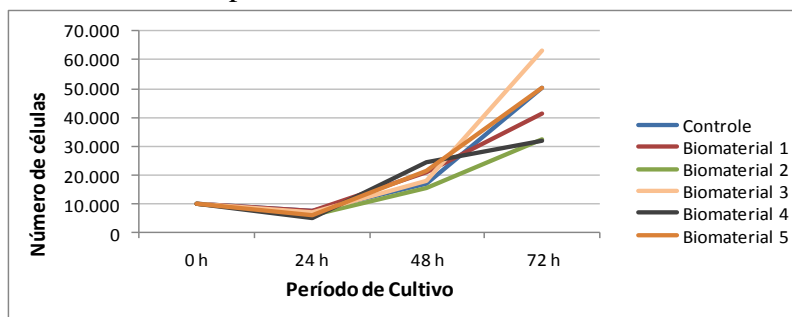
celular. No último período de avaliação, 72 h, os biomateriais 1, 3 e 5 foram superiores aos demais tratamentos e não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Os biomateriais 2 e 4 foram inferiores significativamente se comparados com o controle (Tabela 3 e Gráfico 1).

Tabela 3 – Quantidade de células após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 1 em diferentes tempos.

Tratamentos	Quantidade de Células por Poço			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Controle	10.000 ^a	7.333 ^a	17.000 ^b	50.333 ^{ab}
Biomaterial 1	10.000 ^a	7666 ^a	20.833 ^{ab}	41.166 ^b
Biomaterial 2	10.000 ^a	6.166 ^a	15.666 ^b	32.500 ^c
Biomaterial 3	10.000 ^a	7.000 ^a	18.166 ^{ab}	63.000 ^a
Biomaterial 4	10.000 ^a	4.833 ^a	24.500 ^a	32.000 ^c
Biomaterial 5	10.000 ^a	6.166 ^a	21.666 ^{ab}	50.166 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Fonte: DUARTE, 2015.

Gráfico 1 - Curva de crescimento celular dos fibroblastos após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 1 em diferentes tempos.



Fonte: DUARTE, 2015.

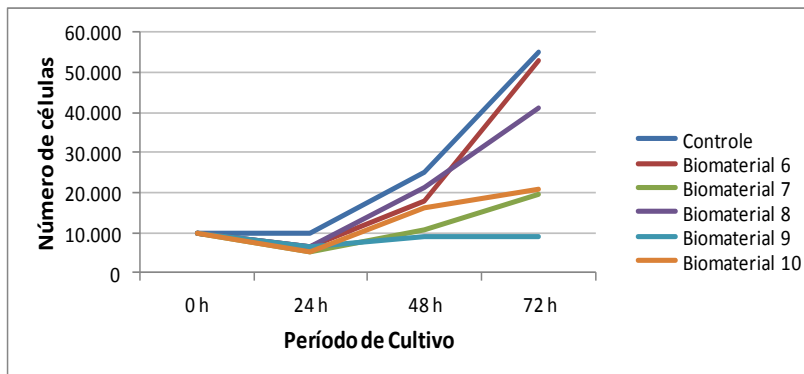
Na avaliação de 24 h da proliferação celular do grupo 2, sinterizados a 1100 °C, não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém ocorreu diferença entre os tratamentos e o controle, sendo que este último apresentou melhor proliferação celular. Em 48h, o biomaterial 8 teve resultado semelhante ao controle e foi superior aos demais tratamentos. Na avaliação de 72 h apenas o biomaterial 6 não apresentou diferença significativa em relação ao controle. Os demais tratamentos foram inferiores ao controle, destacando o biomaterial 9 que apresentou curva descendente de proliferação celular (Tabela 4 e Gráfico 2).

Tabela 4 – Quantidade de células após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 2 em diferentes tempos.

Tratamentos	Quantidade de Células por Poço			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Controle	10.000 ^a	9.750 ^a	25.000 ^a	55.250 ^a
Biomaterial 6	10.000 ^a	6.583 ^b	17.916 ^b	52.833 ^a
Biomaterial 7	10.000 ^a	5.250 ^b	10.583 ^c	19.750 ^c
Biomaterial 8	10.000 ^a	6.666 ^b	21.333 ^{ab}	41.083 ^b
Biomaterial 9	10.000 ^a	6.416 ^b	9.000 ^c	8.916 ^d
Biomaterial 10	10.000 ^a	5.083 ^b	16.250 ^b	20.750 ^c

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Fonte: DUARTE, 2015.

Gráfico 2- Curva de crescimento celular dos fibroblastos após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 2 em diferentes tempos.



Fonte: DUARTE, 2015.

4.3 VIABILIDADE CELULAR

Os cultivos de fibroblastos foram submetidos ao tratamento com os extratos dos diferentes biomateriais, durante 24, 48 e 72h para determinação da função mitocondrial pela redução do MTT. A coloração púrpura do meio, em razão dos cristais de formazan solubilizados, foi observada em diferentes intensidades em todas as amostras testadas, com exceção do controle branco, que continha apenas DMEM.

No grupo 1 no período de 24 h apenas as células tratadas com o extrato do biomaterial 3 apresentaram redução estatisticamente significativa em sua função mitocondrial quando comparadas com o controle, porém foram semelhantes ao 1 e 2. Em 48 h os biomateriais 2 e 3 apresentaram resultados com diferença significativa em relação ao controle, mas foram semelhantes ao biomaterial 1, e o 3 também não diferiu do 4. Já no último período avaliado, 72 h, os biomateriais 1, 4 e 5 não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas com o controle. O resultado do biomaterial 3 foi

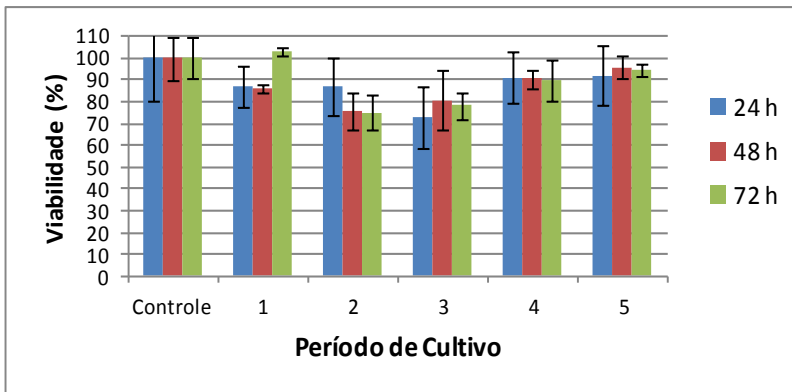
semelhante ao 4, e o 2 diferiu dos demais (Tabela 5 e Gráfico 3).

Tabela 5 - Viabilidade celular (%) medida pelo teste MTT após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 1 em 24, 48 e 72 h.

Tratamentos	Viabilidade Celular (%)		
	24 h	48 h	72 h
Controle	99,9 ^a	100,1 ^a	99,9 ^{ab}
Biomaterial 1	87,5 ^{ab}	85,9 ^{ac}	102,9 ^a
Biomaterial 2	86,9 ^{ab}	75,6 ^c	75,3 ^d
Biomaterial 3	73,1 ^b	80,9 ^{bc}	78,2 ^{cd}
Biomaterial 4	91 ^a	90,6 ^{ab}	90,1 ^{bc}
Biomaterial 5	92 ^a	95,8 ^a	94,9 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Fonte: DUARTE, 2015.

Gráfico 3 - Viabilidade celular (%) medida pelo teste MTT após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 1 em 24, 48 e 72 h.



Fonte: DUARTE, 2015.

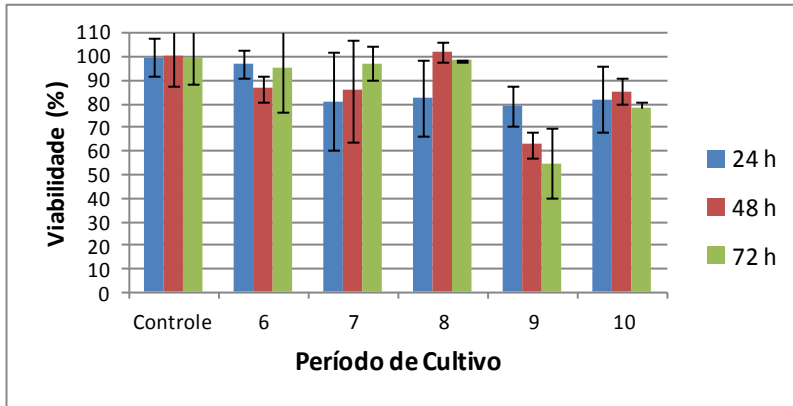
Na avaliação dos biomateriais do grupo 2 no período de 24 h as células tratadas com o extrato dos biomateriais 7, 8 e 9 apresentaram redução estatisticamente significativa em sua função mitocondrial quando comparadas com o controle, porém os tratamentos 7 e 8 foram semelhantes ao 6 e 10. O tratamento 9 apenas não diferiu do 7 e 8. Em 48 h apenas o resultado do biomaterial 9 diferiu do controle, e ele também diferiu estatisticamente dos demais. No último período avaliado, 72 h, os biomateriais 6, 7 e 8 não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas com o controle. O biomaterial 10 se assemelhou ao 6, 7 e 8. E, por último, o biomaterial 9 diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 6 e Gráfico 4).

Tabela 6 - Viabilidade celular (%) medida pelo teste MTT após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 2 em 24, 48 e 72 h.

Tratamentos	Viabilidade Celular (%)		
	24 h	48 h	72 h
Controle	99,9 ^a	100,1 ^a	99,9 ^a
Biomaterial 6	97,2 ^{ab}	86,5 ^a	95 ^{ab}
Biomaterial 7	81,3 ^{bc}	85,7 ^a	97,3 ^{ab}
Biomaterial 8	82,5 ^{bc}	102,3 ^a	98,5 ^{ab}
Biomaterial 9	79,4 ^c	62,7 ^b	54,9 ^c
Biomaterial 10	82 ^{abc}	85,4 ^a	78,4 ^b

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Fonte: DUARTE, 2015.

Gráfico 4 - Viabilidade celular (%) medida pelo teste MTT após contato com o extrato dos diferentes biomateriais do Grupo 2 em 24, 48 e 72 h.

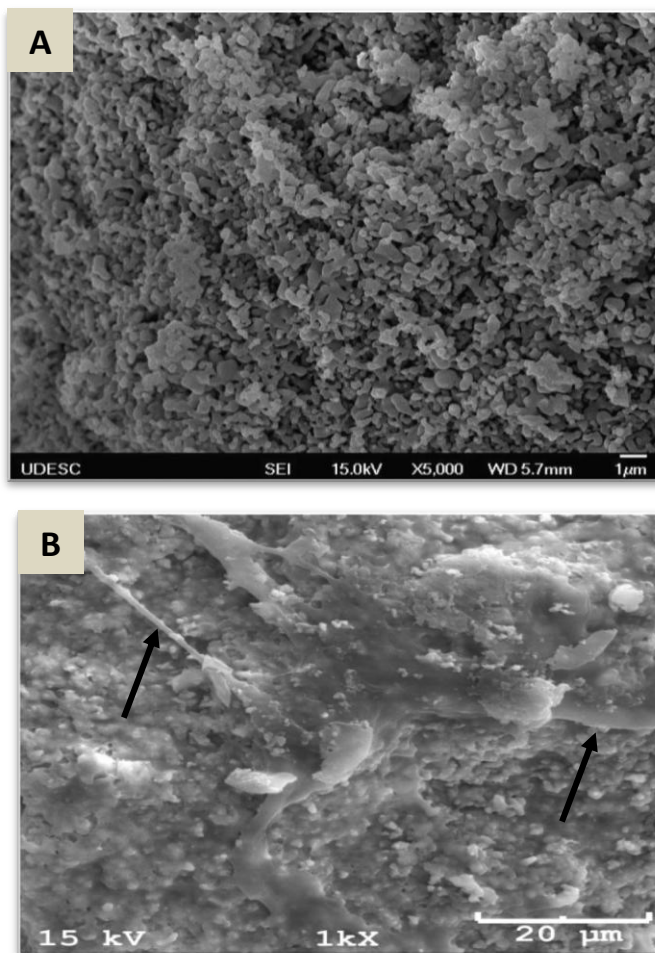


Fonte: DUARTE, 2015.

4.4 INTERAÇÃO CÉLULA-MATERIAL

Através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) observou-se a adesão e proliferação dos fibroblastos sobre os biomateriais de fosfato de cálcio testados (Figura 5). Projeções do tipo filopódios foram observadas, demonstrando a biocompatibilidade dos biomateriais.

Figura 5 – Microscopia Eletrônica de Varredura do biomaterial 5 (1,7M/1200 °C; TCP- β /TCP- α /HA). A) Micrografia mostrando a superfície de fratura do biomaterial (Aumento 5000X). B) Fibroblasto aderido ao biomaterial 5 em contato por 24 h (Aumento 1000X). Observar projeções características de forte adesão. Setas – filopódios.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais UDESC/CCT.

5 DISCUSSÃO

Devido ao aumento da expectativa de vida da população, busca por melhor qualidade de vida e altas taxas de acidentes com lesões ósseas graves, cresce a necessidade de se descobrir novos materiais e aprimorar os materiais substitutos ósseos existentes. Normalmente são utilizados enxertos como maneira de solucionar problemas ósseos, mas esse método apresenta muitas limitações, sendo o uso de biomateriais uma boa alternativa.

Neste trabalho foram testadas quanto a sua citotoxicidade, biocerâmicas de fosfato de cálcio compostas de trifosfato de cálcio- β isolado e a composição bifásica de trifosfato de cálcio- β com hidroxiapatita, provenientes de conchas calcárias fossilizadas, com diferentes razões de Ca/P e temperaturas de sinterização.

Os biomateriais testados no experimento se destacam como materiais substitutos ósseos por apresentarem micro e nanoestruturas microporosas interconectadas, com tamanho de grãos inferiores a 1 μ m e porosidade aberta superior a 44%. Segundo Camargo *et al.* (2014) estas condições são favoráveis para uso destes biomateriais como matriz sintética na recuperação de tecido ósseo lesado. Estas condições estruturais estão de acordo com as características ideais de biomateriais anteriormente descritos por outros autores (LEGEROS *et al.* 2008; SILVA, 2012).

O primeiro nível de teste, dentro da avaliação de biocompatibilidade de um biomaterial é a determinação da citotoxicidade *in vitro*. Este teste é indicado como etapa anterior aos testes em animais e humanos (ISO 10993-5, 1992). Materiais sólidos são normalmente testados através de contato indireto de seus extratos com as células (Leyhausen et al., 1999). Optou-se, neste trabalho, por utilizar-se o extrato das biocerâmicas de fosfato de cálcio, por se tratarem de materiais sólidos com formato cilíndrico, permitindo avaliar se resíduos

tóxicos permaneceram no material após sua produção. Escolheu-se o meio de cultura DMEM como veículo de extração.

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* nem sempre representa o comportamento real do material quando implantado, esta avaliação pode fornecer resultados rápidos a respeito das interações do material em ambientes biológicos (ALONSO, 2011).

No ensaio de redução do MTT no grupo 1 verificou-se que alguns biomateriais provocaram uma redução estatisticamente significativa na função mitocondrial celular em relação ao controle, porém, as células se mantiveram com viabilidade celular acima de 70% em todos os períodos avaliados, confirmando sua biocompatibilidade conforme classificação da ISO 10993-5 (1992). Todavia, na avaliação do grupo 2 alguns biomateriais também apresentaram diferença significativa em relação ao controle, mas, com exceção do biomaterial 9, mantiveram a viabilidade celular acima de 70% em todos os períodos avaliados, não provocando efeitos tóxicos nas células.

As células tratadas com o extrato do biomaterial 9 (80% TCP- β /20% HA, 1,67M/1100 °C) apresentaram redução estatisticamente significativa em sua função mitocondrial quando comparadas com o controle em todos os períodos avaliados, apresentando viabilidade celular abaixo de 70% a partir da avaliação de 48 h, sendo este biomaterial considerado citotóxico, conforme classificação da ISSO 10993-5 (1992).

Alonso (2011) cita que a maioria dos métodos de precipitação utilizados na síntese de fosfatos de cálcio são pouco reprodutíveis, podendo surgir problemas devido à falta de controle sobre fatores que agem na precipitação, como pH, temperatura, relação Ca/P dos reagentes, o que pode ocasionar produtos com diferentes propriedades que contribuem aos diferentes comportamentos *in vivo* ou *in vitro*.

No trabalho de Alonso (2011) o α -TCP provocou uma leve resposta citotóxica após 48h no teste MTT com células mononucleares de sangue periférico, entretanto esse aumento não foi significativo. Segundo o autor, esse aumento pode ser explicado por: (a) variações químicas dos materiais durante o ensaio que acarretam mudanças no pH do meio de cultura, resultando em mais danos celulares; (b) um incremento na liberação de alguns componentes do material, tornando este mais citotóxico ao longo do tempo.

Assim com neste trabalho, vários autores relatam a biocompatibilidade das cerâmicas de fosfato de cálcio. Zhao *et al.* (2015) testaram a viabilidade celular em células-tronco mesenquimais em contato com biomateriais de fosfato de cálcio com cobertura de queratina, e não observou efeitos citotóxicos pelo teste MTT. Chen *et al.* (2014) avaliaram a citotoxicidade de três tipos de fosfatos de cálcio, o TCP- β isolado, o bifásico (HA/ TCP- β) e hidroxiapatita isolada. Não houve diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle no teste MTT, comprovando a biocompatibilidade do material, assim como observado no nosso experimento.

Resultados semelhantes também foram verificados no trabalho de Alcaide *et al.* (2008), testando uma composição de 27%HA/73% β -TCP/agarose em fibroblastos e osteoblastos e concluiu que este biomaterial é biocompatível, com potencial no uso de reparação óssea. Tamai *et al.* (2006) estudaram a citotoxicidade de várias cerâmicas de fosfato de cálcio e observaram que a hidroxiapatita, o trifosfato de cálcio- β e o tetracálcio fosfato não foram citotóxicos, por outro lado, a fluorapatita e o trifosfato de cálcio- α apresentaram alta citotoxicidade aos fibroblastos. Eles justificaram os resultados negativos devido à liberação de íons fluorina no meio pela fluorapatita, e pelo decréscimo de pH ocasionado pela liberação de ácido fosfórico produzido pela hidrólise do trifosfato de cálcio- α .

Montazerolghaem *et al.* (2015) testou cimentos de fosfato de cálcio com monetita em osteoclastos e, não houve alteração na viabilidade celular, ocorrendo a reabsorção do biomaterial pelas células. Zhang *et al.* (2015) demonstrou a citocompatibilidade de compósitos de fosfato de cálcio com sinvastatina em contato com células-tronco de coelhos. Neste caso, a sinvastatina tópica agiu como agente osteogênico. Biocerâmicas bifásicas porosas de TCP- β /HA produzidas via reação de estado sólido em diversas temperaturas foram testadas no ensaio MTT em macrófagos de ratos e não demonstraram citotoxicidade (WEBLER *et al.*, 2014).

Estudos *in vivo* com materiais bifásicos de fosfato de cálcio (BCP) semelhantes aos testados em nosso trabalho foram previamente realizados. Em um deles, Daculsi *et al.* (1998) analisaram a composição bifásica de trifosfato de cálcio- β (TCP- β) com hidroxiapatita (HA) com diferentes proporções de massa de TCP- β /HA em defeitos ósseos de cães. Observaram que a reabsorção e bioatividade (liberação de íons de interesse biológico) das cerâmicas bifásicas podem ser controladas pela variação da proporção TCP- β /HA, onde quanto maior a proporção, maior a reabsorção quando implantado. As três composições de TCP- β /HA testadas apresentaram a mesma evolução e adaptação no tecido implantado.

Kim *et al.* (2014) analisaram BCP preparadas pelo método de réplica da esponja polimérica e concluíram que o material testado por MTT em osteoblastos não provocou efeitos tóxicos. Também implantaram o material em calvária de ratos e, após 8 semanas constataram a regeneração óssea na região. Regalin (2014) implantou hidroxiapatita isolada, tricálcio fosfato- β isolado e a associação HA/TCP- β (60/40) em defeitos ósseos produzidos em tíbias de ovinos e observou boa capacidade de reparação óssea em todos os biomateriais testados, sugerindo seu uso como substitutos ósseos.

Na avaliação da curva de crescimento do grupo 1, observou-se no último período de avaliação, 72h, que todos os biomateriais não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, demonstrando que as variações observadas em 24 e 48h, não inviabilizaram o crescimento celular. Na curva de crescimento do grupo 2, na avaliação de 72h, apenas o biomaterial 6 não apresentou diferença significativa em relação ao controle. Os demais tratamentos foram inferiores ao controle, porém mantiveram a curva de crescimento crescente. Ao contrário do biomaterial 9 que apresentou curva descendente de proliferação celular, inviabilizando progressivamente a multiplicação das células, assim como já destacado no teste MTT, onde este material provocou citotoxicidade.

Fricain *et al.* (2002) também utilizaram a taxa de proliferação celular (curva de crescimento) como um dos parâmetros para avaliação de citotoxicidade de biomateriais produzidos a partir do exoesqueleto de corais. Observaram uma menor proliferação das células em contato com o biomaterial se comparado com o controle, porém classificaram como um efeito citotóxico moderado e atestaram a biocompatibilidade do material.

A avaliação da biocompatibilidade em experimentos *in vitro* com culturas de células pode ainda ser determinada através de microscopia eletrônica de varredura, analisando-se a adesão, bem como a proliferação celular sobre o material estudado (ANSELME, 2000). Vários trabalhos avaliaram a biocompatibilidade *in vitro* de biomateriais, através de ensaios de citotoxicidade em consonância com a microscopia eletrônica de varredura (ALCAIDE *et al.*, 2008; ALONSO, 2011; CHEN, 2014; CORREA, *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2002; MONTAZEROLGHAEM *et al.*, 2015; SIQUEIRA, *et al.*, 2015; TAKAMORI, 2004; ZHANG *et al.*, 2015). Neste trabalho foi realizada a avaliação da interação célula-material através de MEV e observou-se que houve adesão e proliferação

dos fibroblastos sobre os biomateriais testados. Também constatou-se a formação de prolongamentos finos e longos nos fibroblastos, os filopódios, demonstrando a compatibilidade das células com o biomaterial. Estas observações concordam com os resultados obtidos no teste de citotoxicidade, com exceção do biomaterial 9, que mostrou-se tóxico aos fibroblastos no teste MTT.

Takamori (2004) destaca que efeitos citotóxicos observados *in vitro* não significam, necessariamente, toxicidade *in vivo*. No sistema *in vitro*, as células estão expostas diretamente ao material ou seus produtos e o meio não se renova por cerca de 2 a 3 dias, concentrando possíveis componentes tóxicos. No organismo vivo, a homeostase proporcionada pelos fluidos pode agir protegendo o organismo, removendo as toxinas do local de implantação, se o fator em questão for solúvel.

Deve-se levar em consideração que apenas os resultados obtidos nos testes de citotoxicidade não são os únicos parâmetros para se avaliar a biocompatibilidade de um biomaterial. É necessário testar simultaneamente outros aspectos do comportamento e função celular que evidenciam a resposta das células perante a presença de biomateriais e combinar os resultados obtidos nos diferentes tipos de ensaio. Desta forma, com a interpretação integrada dos testes *in vitro* pode-se ter uma ideia do comportamento *in vivo* de um novo biomaterial (GOMES *et al.*, 2001).

Estudos *in vitro* e *in vivo* com células-tronco em contato com os biomateriais testados deveriam ser realizados, para otimizar a terapia de substituição óssea.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados deste estudo sugerem que o contato de fibroblastos com os diferentes extratos de biomateriais cerâmicos de fosfato de cálcio influencia na proliferação destas células, porém mantendo sua viabilidade. Apenas o biomaterial 9 (80% TCP- β /20% HA, 1,67M/1100 °C/2h) provocou uma curva de crescimento celular descendente e citotoxicidade. Os demais biomateriais se mostraram biocompatíveis nas condições avaliadas.

O cultivo de fibroblastos com os cilindros dos biomateriais proporcionou a adesão e a proliferação celular, verificada através da MEV, sugerindo o seu potencial como biomaterial.

Estudos *in vivo* devem ser realizados com esses materiais para verificar seu comportamento dentro do organismo vivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCAIDE, M. *et al.* L929 fibroblast and SAOS-2 osteoblast response to hydroxyapatite- β TCP/agarose biomaterial. **Wiley InterScience**. Abr., 2008.

ALMEIDA, U. **Análise e utilização de biomaterial confeccionado a partir das conchas de *Crassostrea gigas* em defeito periodontal em ratos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia Clínica) - Universidade Positivo, Curitiba, 2010. 59 p.

ALONSO, L.M. **Avaliação de cimentos ósseos de fosfato de cálcio com adições de aluminato e silicato de cálcio**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**. v.21, p. 667-681, 2000.

BARILE, F. A. **Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods**. Ed. CRC Press: Boca Raton, 1994. 222 p.

BAXTER, L. C. *et al.* Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. **European Cell and Materials**, v.4, p. 1-17. 2002.

BELLINI, O. J. **Síntese e caracterização de uma matriz óssea de fosfato de cálcio e nanocompósitos fosfato de cálcio/SiO₂ para substituição e regeneração óssea**. 2007.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2007.

BEST, S.M. Bioceramics: Past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**. v. 28, p. 1319-1327, 2008.

CAMARGO, N.H.A.; SOARES, C.; GEMELLI, E. Elaboration and characterization of nanostructured biocements for biomedical applications. **Material Research**, v. 10, n. 2 p. 135-140, 2007.

CAMARGO, N.H.A.; FRAN CZAK, P.F.; GEMELLI, E.; DA COSTA, B.D.; DE MORAES, A.N. Characterization of three calcium phosphate microporous granulated bioceramics. **Advanced Materials Research**. v. 936, p. 687-694, 2014.

CHEN, Y.; *et al.* Enhanced effect of β -tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: In vitro and in vivo evidence. **Acta Biomaterialia**, set. 2014.

CONSTANTINO, P. D. *et al.* Hydroxyapatite cement: Basic chemistry and histologic properties. **Arch. Otolaryngol Head Neck Surgery**, v. 117, p. 379-384, 1991.

CORREA D.; ALMIRALL, A.; CARRODEGUAS, R.G.; DOS SANTOS, L.A.; DE AZA, A.H.; PARRA, J.; MOREJÓN, L.; DELGADO, J.A. α -Tricalcium phosphate cements modified with b-dicalcium silicate and tricalcium aluminate: Physicochemical characterization, in vitro bioactivity and cytotoxicity. **Journal of Biomedical Material Research, Part B**, 2014.

DACULSI, G., Biphasic Calcium Phosphate Concept Applied to Artificial Bone, Implant Coating and Injectable Bone Substitute, **Biomaterials**, vol. 19, p. 1473-1478, 1998.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). In: **Microscopia Eletrônica de Varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Edipucrs, Porto Alegre, cap.1, p. 9-26, 2007.

DEMERS, C.; et al. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A Review. **Bio-Medical Materials and Engineering**. p. 1-21, 2001.

DI SILVIO, L. **Cellular response to biomaterials**. Woodhead Publish Limited, England, 2009.

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

DOROZHKIN, S. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31. p. 1465-85, 2010.

DOS SANTOS, L.A.; *et al.* α -Tricalcium phosphate cement: “in vitro” cytotoxicity. **Biomaterials**. v. 23. p. 2035-2042, 2002.

DOS SANTOS, R.B.M. **Síntese e caracterização de pós nanoestruturados de fosfato de cálcio e nanocompósitos hidroxiapatita/sílica gel**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, SC. 2009. 87p.

ELLIOT, J.C. **Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates**. Amsterdam: Elsevier Science. 1994. 389 p.

FELLAH, B.H.; *et al.* Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. **Biomaterials**. v. 29. p. 1177–88. 2008.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 4 ed. Wiley-Liss, 2000. 577p.

FRICAIN, J.C. *et al.* Cytocompatibility study of organic matrix extracted from Caribbean coral porites astroides. **Biomaterials**. v. 23. p. 673–679. 2002.

GAO, Y. *et al.* Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone. **Journal of Material Science**. v. 17. p. 815–823. 2006.

GOMES, M.E. *et al.* Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymers: effect of several additives and processing conditions. **Biomaterials**. v. 22. p. 1911-1917. 2001.

GINEBRA, M.P. **Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico alfa para aplicaciones quirúrgicas**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidad Politécnica de Catalunã, Barcelona, Espanha, 1996.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **ALTEX**, n. 20, p.275-281, 2003.

HARLEY, C.B.; FUTCHER, A.B.; GREIDER, C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**. Vol. 345, 1990.

HAYFLICK, L; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**. n. 25. p. 585-621. 1961.

HENCH, L.L. Bioceramics: From concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**. v.74, p. 1487-510. 1991.

HINZ, B. *et al.* The myofibroblast: one function, multiple origins. **The American Journal of Pathology**. v. 170. n. 6. p. 1807-1816. Jun. 2007.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods. **International Organization for standardization**, Geneva, 1992.

KAMITAKAHARA, M.; OHTSUKI, C.; MIYASAKI, T. Review Paper: Behavior of Ceramic Biomaterials Derived from Tricalcium Phosphate in Physiological Condition. **Journal of Biomaterials Applications**. v. 23. p.197-212. 2008.

KIM, N.W. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**. v. 266. p. 2011-2015. 1994.

KIRKPATRICK, C.J.; MITTERMAYER, C. Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. p. 9-13. 1990.

KOLK, A. *et al.* Current trends and future perspectives of bone substitute materials - From space holders to innovative biomaterials. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery.** Munich, p. 706-718, 3 jan. 2012.

KUMTA, P.N.; SFEIR, C.; LEE, D.; OLTON, D.; CHOI, D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. **Acta Biomaterialia**, p. 65-83. 2005.

LEGEROS, R.Z. *et al.* Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chemical Reviews.** v. 108. n. 11. p. 4742-4753. 2008.

LYGRE, H. *et al.* Biologic testing of leachable aromatic compounds from denture base materials. **Acta Odontologica Scandinavica.** v. 53. p. 397-40. 1995.

LYNCH, R.G. Tissue culture of mammalian cells. **ASIP Pathways.** v. 3. n. 2. 2008.

MARQUES, A.P. *et al.* The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. **Biomaterials.** v. 23. p. 1471-1478. Mar, 2002.

MENDES, F.A.A. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita e compósitos a partir de matéria-prima reciclada.** Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG. 2006. 181 p.

MONTAZEROLGHAEM, M.; KARLSSON OTT M.; ENGQVIST, H.; MELHUS, H.; RASMUSSEN, A.J.

Resorption of monetite calcium phosphate cement by mouse bone marrow derived osteoclasts. **Materials Science and Engineering**. p.212–218. 2015.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65. p. 55-63. 1983.

NICHOLAS, J.S. **Ross Granville Harrison 1870-1959**. Washington: National Academy of Sciences.1961.

RAAB, S. *et al.* A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. **Stem Cells International**. v. 2014. p. 1-12. 2014.

RATNER, B.D. *et al.* **Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine**. Academic Press. 2 ed. 1996. 497p.

REGALIN, B.D.C. **Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos**. 21/02/2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC. 2014. p. 80.

SANCHÉZ-SALCEDO, S.; *et al.* In vitro structural changes in porous HA/ β -TCP scaffolds in simulated body fluid. **Acta Biomaterialia**. v. 5. p. 2738–2751. 2009.

SILVA, D.F. **Síntese e Caracterização de Biomateriais de Fosfatos de Cálcio a Partir de Conchas Calcárias Fossilizadas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Joinville, SC. 2012. 124p.

SILVA, M.A.; GUIMARÃES, P.C.; PEREIRA, T.D.; HONÓRIO-FRANÇA, A.C. Biomateriais e sua biocompatibilidade numa abordagem multidisciplinar na área de saúde, alimentos funcionais e medicina regenerativa. **Interdisciplinar: Revista Eletrônica da Univar.** n.8, v.1, p. 87 -90, 2012.

SILVA, D.F.; CAMARGO, N.H.A.; MAMANI, C.T.; FRANÇAK; P.F.; ECKSTEIN, M.B.R.; POSSAMAI, M.D. Caracterização Microestrutural e Física de Biomateriais de Fosfatos de Cálcio Obtidos a Partir de uma Matéria Prima Natural. **Congresso Brasileiro de Cerâmica.** Aracajú, SE. 2015.

SIQUEIRA, L.C.B. **Formulação e caracterização de biomateriais compósitos com hidroxiapatita.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campo dos Goytacazes, RJ. 2009. 136 p.

SIQUEIRA, L.; *et al.* Influence of the addition of β -TCP on themorphology, thermal properties and cell viability of poly (lactic acid) fibers obtained by electrospinning. **Materials Science and engineering.** p. 135-143. 2015.

SLOCUM, H.K. *et al.* Characterization of cells obtained by mechanical and enzymatic means from human melanoma, sarcoma, and lung tumors. **Cancer Research.** n.41. p. 1428-1434. 1981.

SNYDER, S.H. Neuroscience at Johns Hopkins. **Neuron.** v. 48. p. 201-211. 2005.

TAMAI, M. *et al.* Cytotoxicity of various calcium phosphate ceramics. **Key Engineering Materials**. v. 309-311. p. 263-266. 2006.

TANUR, A.E., *et al.* Insights into the composition, morphology, and formation of the calcareous shell of the serpulid *Hydroides dianthus*. **Journal of Structural Biology**. v. 169. p. 145-160. 2010.

TAKAMORI, E.R. **Estudo *in vitro* da citotoxicidade do osso bovino misto quimicamente tratado**. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, 2004.

URIO, M. **Viabilidade de células bovinas submetidas a diferentes estratégias de criopreservação**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC. 2012.

WANG, X. *et al.* Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. **Biomaterials**. v. 22. p. 2247-2255. 2001.

WANG, J., CHEN Y., ZHU X., YUAN T., TAN Y., FAN Y. Effect of phase composition on protein adsorption and osteoinduction of porous calcium phosphate ceramics in mice. **Journal of Biomedical Material Research**. Part A. p. 2247-2255. 2014.

WEBLER, G.D. *et al.* Characterization and evaluation of cytotoxicity of biphasic calcium phosphate synthesized by a solid state reaction route. **Current Applied Physics**. v. 14. p. 876-880. 2014.

WENNERBERG, A. *et al.* A method for toxicity screening of biomaterials using cells culture on Millipore filters. **Journal of Biomedical Material Research.** v. 13. p. 109-20. 1979.

WILLIAMS, D. F. Definitions in Biomaterials. **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters.** v. 26, n. 9. p. 381-416. 1987.

WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials** v. 29. p. 2941–2953. 2008.

WITKOWSKY, J.A. Dr. Carrel's immortal cells. **Medical History.** n. 28. p. 129-142. 1980.

YUAN, H., *et al.* Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. **Tissue Engineering.** v. 12. p. 1607–15. 2006.

YUASA, T. *et al.* Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Biomaterials.** v. 25. p. 1159-1166. 2004.

ZHANG, H. *et al.* Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research.** Part A. p. 1-9. 2015.

ZHAO, X. *et al.* Calcium phosphate coated Keratin–PCL scaffolds for potential bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering.** p. 746–753. 2015.