Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Desenvolvimento, caracterização física e química e análise de propriedades osteogênicas de cimento ósseo poroso à base de PMMA contendo estrôncio

Larissa Tomazela

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2020

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Desenvolvimento, caracterização física e química e análise de propriedades osteogênicas de cimento ósseo poroso à base de PMMA contendo estrôncio

Larissa Tomazela

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ramos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Tomazela, Larissa

Desenvolvimento, caracterização física e química e análise de propriedades osteogênicas de cimento ósseo poroso à base de PMMA contendo estrôncio. Ribeirão Preto, 2020.

110 p. :40 il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Ramos, Ana Paula.

1. Cimento ósseo poroso. 2. Polimetilmetacrilato (PMMA). 3. Substituto ósseo. 4. Osteointegração. 5. Hidroxiapatita substituída 6. Liberação Sr^{2+} .

*“Mas é preciso ter força
É preciso ter raça
É preciso ter gana sempre
Quem traz no corpo a marca
Maria, Maria
Mistura a dor e a alegria
Mas é preciso ter manha
É preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida”*

(Milton Nascimento)

*À minha mãe Cristiane e ao meu pai Carlos
Emerson, meus maiores exemplos. Vocês são a
prova de que o amor verdadeiro existe.*

Agradecimentos

Agradeço à Deus e Nossa Senhora Aparecida por todas as bênçãos concedidas e por me guiarem durante esta jornada.

Aos meus pais, Cristiane e Carlos Emerson, meus maiores exemplos de determinação e força, sempre me mostrando que depois da tempestade vem o sol. Obrigada por estarem ao meu lado tanto nos momentos difíceis quanto nos bons, e por sempre me apoiarem a correr atrás dos meus sonhos. Sem vocês nada disso seria possível, vocês são minha base, minha vida, meus heróis. Sou eternamente grata a vocês.

À Profª. Dra. Ana Paula Ramos, minha orientadora, pela oportunidade e liberdade que me concedeu, assim como por todo o incentivo e ensinamentos que me tornaram uma melhor cientista. Também agradeço pelo respeito, confiança, companheirismo e carinho de sempre. Foi uma honra trabalhar ao seu lado.

A todos os membros do Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides que foram meu apoio, tornando estes dois anos inesquecíveis. Em especial ao Marcos, Tamires, Lucas, Camila, João e Guilherme. Não consigo descrever em palavras como vocês foram imprescindíveis nesta caminhada, só tenho a agradecer pelo grande laço de amizade que formamos. Independente de estarmos perto ou longe fisicamente, sempre estaremos próximos em alma e coração. Assim como minha mãe diz, vocês são minha família de coração. Muito obrigada por todos os momentos incríveis que passamos juntos.

Aos meus avós, tias, tios e primos, por sempre estarem ao meu lado me apoiando, me confortando e me fazendo rir. Com vocês me sinto em casa, acolhida e muito feliz. Vocês são tudo para mim!

Um agradecimento especial para o Guilherme, que além de um grande amigo, é a pessoa que venho tendo o prazer de compartilhar meus passos e conquistas.

Aos amigos que caminharam comigo desde antes do começo até o fim deste projeto, mesmo não fazendo parte de nosso laboratório. Minhas amigas do ensino médio, meus amigos de graduação, e também aos meus amigos do departamento. Em especial aos que estão comigo praticamente todos os dias, me fazendo rir e descontraír na loucura do dia a dia: Claudio, Luiz Fernando, Roberta, Luiz Henrique e Karmel. Também aos que já se foram, mas ainda assim alegram meus dias: Hiskell e Lucas Urbano. Obrigada a todos por acompanharem os passos dessa trajetória não só cientificamente, mas também com muito carinho envolvido.

Ao Prof. Dr. Edgard Eduard Engel e Profª. Dra. Maria Sol Brassesco pelo apoio e oportunidade de difundirmos conhecimentos científicos relacionados ao projeto em questão. Também agradeço às alunas Larissa Aine do Nascimento e Cecília Fagundes.

Ao Prof. Dr. Pietro Cianglini e seu aluno de pós-doutorado Bruno Zoccaratto Favarin pela colaboração com os experimentos de culturas de células.

À Ariane Zamarioli do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e me ensinado a realizar as análises morfométricas das amostras e discutir os resultados obtidos.

À Profa. Dra Márcia Andreia Mesquita Silva da Veiga e seus alunos Luiza Carolina Pomarolli e Maycon Lucas de Oliveira pela disponibilidade e ajuda com os experimentos de espectrometria de absorção atômica.

Agradeço também à FAPESP (Processo- 2017/08892-9) e CAPES pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste projeto de mestrado.

Sumário

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índice de Figuras.....	v
Índice de Tabelas.....	ix
Siglas e abreviações	x

Introdução

1.1. Entendendo a natureza do tecido ósseo	12
1.2. O osso: uma fonte de inspiração na fabricação de biomateriais	19
1.3. Cimento ósseo à base de PMMA: Um antigo material no futuro.....	23
1.4. O papel do Sr^{2+} no metabolismo ósseo	30

Objetivos

2.1. Objetivo Geral.....	33
2.2. Objetivos específicos	33

Metodologia

3.1. Síntese de nanopartículas de hidroxiapatita substituídas por Sr^{2+} (Ca-Sr-HA)	35
3.2. Caracterização química das partículas Ca-Sr-HA	35
3.3. Preparo de cimento ósseo poroso à base de PMMA contendo partículas Ca-Sr-HA	37
3.3.1. Avaliação do tempo de secagem e da temperatura máxima de polimerização das amostras (T_{máx}).....	39
3.3.2. Avaliação morfológica dos corpos de prova por MEV.....	40
3.3.3. Caracterização estrutural dos cimentos ósseos após a incorporação de Ca-Sr-HA pela técnica de DRX.....	40
3.3.4. Análise elementar e mapeamento	40
3.3.5. Medida de variação de pH	40
3.3.6. Avaliação morfométrica (3D) por Microtomografia Computadorizada (micro-CT) ..	41
3.3.7. Ensaio de compressão	41

3.3.8.	Estudo <i>in vitro</i> de liberação de Sr^{2+} e Ca^{2+}	42
3.3.9.	Avaliação <i>in vitro</i> da bioatividade dos cimentos ósseos.....	43
3.3.10.	Testes de viabilidade celular.....	43
3.3.11.	Análise Estatística.....	44

Resultados e Discussão

4.1.	Caracterização química das partículas Ca-Sr-HA	46
4.2.	Caracterização dos cimentos ósseos porosos à base de PMMA carregados com Ca-Sr-HA	61
4.2.1.	Avaliação do tempo de secagem e da temperatura máxima de polimerização das amostras (T_{máx}).....	62
4.2.2.	Avaliação morfológica dos corpos de prova por MEV.....	65
4.2.3.	Caracterização estrutural dos cimentos ósseos após a incorporação de Ca-Sr-HA pela técnica de DRX	67
4.2.4.	Análise elementar e mapeamento	68
4.2.5.	Medida de variação de pH	72
4.2.6.	Avaliação morfométrica (3D) por Microtomografia Computadorizada micro-CT	73
4.2.7.	Ensaio de compressão	80
4.2.8.	Estudo <i>in vitro</i> de liberação de Sr^{2+} e Ca^{2+}	83
4.2.9.	Avaliação <i>in vitro</i> da bioatividade dos cimentos ósseos.....	87
4.2.10.	Testes de viabilidade celular.....	92

Conclusões

Referências

Resumo

Há mais de 50 anos cimentos ósseos à base de polimetilmetacrilato (PMMA) vêm sendo utilizados em ortopedia na fixação de implantes metálicos ou como substitutos ósseos devido a sua excelente biocompatibilidade, baixo custo, moldabilidade e estabilidade mecânica logo após a implantação. Apesar de suas inúmeras vantagens e amplo uso, muitos estudos reportam soltura asséptica deste implante após implantação. De fato, os cimentos ósseos à base de PMMA não são bioativos, o que ocasiona a formação de uma camada de tecido fibroso ao redor do implante e consequentemente sua soltura. Além disso, durante a polimerização esse material pode atingir temperaturas altas o suficiente para ocasionar necrose em tecidos adjacentes. Finalmente, sua resistência superior à de ossos trabeculares pode diminuir a remodelação e densidade óssea, levando ao enfraquecimento deste tecido. Nesse sentido, pesquisas intensas vêm sendo realizadas visando melhorar as propriedades mecânicas, térmicas e biológicas deste material. Com este fim, este estudo propôs o desenvolvimento de um cimento ósseo poroso à base de PMMA carregado com nanopartículas de hidroxiapatita substituída por Sr^{2+} (nomeado Ca-Sr-HA). Esse material cerâmico apresenta conhecida bioatividade, e íons Sr^{2+} são conhecidos por regular a atividade de osteoblastos e osteoclastos. Ainda, a adição de poros ao material pode diminuir sua resistência para valores mais próximos do osso e fornecer a microarquitetura necessária para vascularização, adesão e proliferação celular, e consequentemente, crescimento de tecido ósseo no *bulk* e na interface cimento-osso. A princípio, hidroxiapatita substituída por diferentes porcentagens molares de Sr^{2+} (0-100% Sr^{2+}) foi sintetizada e tratada termicamente a 600°C para posterior incorporação nos cimentos de PMMA. Os padrões de difração de raios-X (DRX) evidenciaram picos relacionados à HA para 0% de Sr^{2+} com conversão total para fase pura indexada estrôncio apatita em 100% Sr^{2+} . O maior conteúdo de íons Sr^{2+} na estrutura cristalina da HA ocasionou aumento nos parâmetros de rede e na distância interplanar deste mineral como resultado do maior tamanho do íon, assim como evidenciado por DRX. Adicionalmente, essas nanopartículas apresentaram morfologia esférica com valores negativos de potencial zeta para todas as porcentagens molares de Sr^{2+} , o que pode estimular maior adesão de proteínas e melhor proliferação celular. Após a incorporação de Ca-Sr-HA na matriz de PMMA, imagens de MEV e microtomografia computadorizada (micro-CT) mostraram que as partículas estavam localizadas preferencialmente na superfície dos poros o que permitiu que a matriz atuasse na liberação controlada de Sr^{2+} em PBS e meio de cultura, em concentrações variando de 20 a 210 mg/L. Essa ampla faixa de concentração está dentro da faixa terapêutica desses íons para o tratamento de osteoporose. Ainda, a análise por micro-CT confirmou a porosidade aberta e a interconectividade dos poros, características essenciais para a nutrição, proliferação e migração celular. Os testes biomecânicos do cimento evidenciaram módulo de Young comparável ao osso esponjoso, indicando que este material imita as propriedades mecânicas desse tecido, reduzindo o risco de fraturas nos ossos adjacentes e o afrouxamento asséptico pela formação da camada de tecido fibroso. Ainda, o tempo de cura e a temperatura de polimerização não foram alterados pela presença de partículas e estavam de acordo com as exigências da ISO 5833. Aumento na bioatividade *in vitro* na presença de maiores quantidades de íon Sr^{2+} foi revelada pela formação de uma camada de apatita na superfície do cimento após a exposição ao fluido corporal simulado. Finalmente e mais interessante, as amostras não mostraram efeitos de citotoxicidade em culturas de osteoblastos e tendência no aumento da proliferação celular com aumento da concentração de Sr^{2+} liberado foi observada. Esse conjunto de dados confirma que esses materiais podem ser potencialmente aplicados como substitutos ósseos.

Abstract

For more than 50 years, polymethylmethacrylate (PMMA)-based bone cement has been used in orthopedics to fix metal implants and as bone substitutes due to its excellent biocompatibility, low cost, moldability, and high mechanical stability after implantation. Despite its widespread use and numerous advantages, many studies report aseptic loosening of the material after implantation. In fact, PMMA bone cement is not bioactive, causing the formation of a fibrous layer around the implant and consequently loosening. Moreover, during polymerization, this material can achieve temperatures high enough to cause necrosis in adjacent tissues. Finally, its resistance higher than spongy bone can decrease bone remodeling and density, leading to the weakening of this tissue. In this sense, intense research has been performed to improve mechanical, thermal and biological properties of this material. In this sense, this study proposed the development of a PMMA-based porous bone cement loaded with strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles (Ca-Sr-HA). This ceramic material presents well described bioactivity, and Sr^{2+} ions are known to regulate the activity of osteoblasts and osteoclasts. Also, addition of pores to the material can decrease its resistance to values closer to the bone and provide the microarchitecture necessary for vascularization, adhesion and cell proliferation, and consequently, bone tissue growth in the bulk and at the bone-cement interface. At first, HA replaced by different molar percentages of Sr^{2+} (0-100% Sr^{2+}) was synthesized and heat treated at 600°C for later incorporation into PMMA cements. X-ray diffraction patterns showed HA-related peaks for 0% Sr^{2+} with total conversion for strontium apatite at 100% Sr^{2+} . The higher content of Sr^{2+} ions in the crystalline structure of HA caused an increase in the cell lattice parameters and in the interplanar distance of this mineral as a result of the larger size of this ion, as evidenced by XRD. Additionally, these nanoparticles showed spherical morphology with negative values of zeta potential for all molar percentages of Sr^{2+} , which can stimulate higher protein adhesion and better cell proliferation. After Ca-Sr-HA incorporation into PMMA matrix, SEM and computerized microtomography (micro-CT) images showed that the particles were preferentially located at the surface of the pores, which allowed the matrix to act in the controlled release of Sr^{2+} in PBS and in growth medium, at concentrations ranging from 20 to 210 mg/L. This wide range of concentrations is within the therapeutic range of Sr^{2+} doses for osteoporosis treatment. Also, micro-CT analysis confirmed the open porosity and interconnectivity of pores, which are essential features for cell nutrition, proliferation and migration. A porous surface is able to improve mechanical stability of the implant by mechanical interlocking of the cement to bone. Biomechanical tests of cement revealed Young's modulus comparable to spongy bone, indicating that this material mimics the mechanical properties of this tissue, reducing the risk of fractures in adjacent bones and aseptic loosening due to the formation of a fibrous tissue layer. Furthermore, setting time and polymerization temperature were not altered by the presence of particles and were in accordance with the requirements of ISO 5833. Increased bioactivity *in vitro* in the presence of higher content of Sr^{2+} was revealed by the formation of an apatite layer on the cement surface after exposure to the simulated body fluid. Finally, and more interestingly, the samples did not show cytotoxic effects on osteoblast cultures and presented tendency to increase cell proliferation with increased content of Sr^{2+} released. This set of data confirms that these materials can be potentially applied as bone-substitutes.

Índice de figuras

- Figura 1.** Morfologia e organização dos cristais do mineral ósseo na matriz óssea vista em diferentes orientações. A primeira coluna mostra a orientação das seções em relação a matriz. As colunas do meio mostram imagens de microscopia das seções realizadas. A terceira coluna esquematiza o modelo 3D do mineral ósseo visto nas diferentes projeções. (Imagem adaptada da referência 3). 13
- Figura 2.** (a) Visão lateral das fibrilas de colágeno no arranjo referido como *oscilating plywood* nos ósteons: as fibrilas realizam uma oscilação sinusoidal entre 0 e 30°; (b) visão lateral das fibrilas de colágeno no arranjo referido como *twisted plywood* nos ósteons: as fibrilas rotacionam em ângulo constante em relação as vizinhas; (c) estrutura helicoidal de um cristal líquido colestérico; (d) e (e) corte oblíquo mostrando um artefato visual arqueado como resultado da estrutura nomeada *twisted plywood* e (f) esquema da orientação helicoidal de um ósteon (tracejado mais escuro) na tíbia. (Imagem adaptada das referências: a e b²¹; c e d⁶, e²², f²⁵). 15
- Figura 3.** Esquema dos 12 níveis de organização hierárquica do tecido ósseo. Os ossos como um todo (XII) são compostos por diferentes razões de osso compacto (denso) e trabecular (poroso) (XI). Em mamíferos, o osso compacto e trabecular são geralmente constituídos por osso lamelar, onde as lamelas encontram-se organizadas em ósteons e pacotes lamelares (X), respectivamente. As lamelas (IX) são formadas pelo empilhamento em diferentes orientações de camadas de feixes cilíndricos paralelos (verde), onde um material desordenado (azul) separa as camadas e os feixes vizinhos, como uma fase contínua. Os feixes cilíndricos (VIII) são super-estruturas originadas pela organização das fibrilas de colágeno mineralizadas (padrão ordenado). Similarmente, o material desordenado é formado por fibrilas de colágeno mineralizadas (VI), porém em um padrão desordenado (VII). As fibrilas de colágeno surgem através do empacotamento de microfibrilas (V), as quais são compostas por triplas-hélices de colágeno (IV) escalonadas, que por sua vez são formadas por cadeias peptídicas (III) com uma sequência repetitiva de aminoácidos (II). O componente inorgânico das fibrilas de colágeno mineralizadas (VI) também apresenta diferentes níveis de organização, sendo eles: agregados de mineral (V), pilhas de plaquetas (IV), plaquetas (III) e cristais aciculares (II). (Imagem adaptada da referência 3). 16
- Figura 4.** Representação das diferentes células presentes no tecido ósseo. Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas de células-tronco hematopoiéticas, responsáveis pela reabsorção da matriz óssea mineralizada. Por sua vez, os osteoblastos são derivados de células-tronco mesenquimais e atuam no processo de formação óssea. Ao fim da produção da matriz mineralizada, os osteoblastos podem ser embebidos na matriz óssea como osteócitos, ser transformados em células de revestimento ou sofrer apoptose. (Imagem adaptada da referência 29). 19
- Figura 5.** Uma breve história do cimento ósseo à base de polimetilmetacrilato. A história do PMMA se inicia em 1901 com o estudo dos produtos de polimerização do ácido acrílico por Otto Rohm. Em 1907, Otto fundou uma empresa (Rohm and Hass) que foi responsável por difundir este polímero pelo mercado. O PMMA ficou bem conhecido por suas propriedades excepcionais que combinavam transparência, rigidez e flexibilidade, e sua primeira aplicação biomédica foi na produção e reparos de dentaduras (1935). Em 1936, a empresa Kulzer descobriu que ao misturar o PMMA sólido com seu monômero líquido ocorria a formação de uma massa que enrijecia com o tempo através da adição de peróxido de benzoíla e calor. No período da Segunda Guerra Mundial, grande parte das cabines de aviões e periscópios de submarinos foram construídos com este polímero, e os pilotos que tiveram seus olhos atingidos por fragmentos deste plástico não sofreram nenhum tipo de resposta inflamatória. Este acidente comprovou a biocompatibilidade deste material, o qual passou a ser aplicado na fabricação de lentes intraoculares e em cirurgias de cranioplastia. Após este evento, a utilização deste biomaterial na fabricação de próteses com fim ortopédico aumentou, até que em 1960, John Charnley realizou uma grande inovação no campo de artroplastias pela utilização da massa de polímero na fixação de componentes metálicos. Essa

massa atuava como um “rejunte” que preenchia os espaços entre a prótese e o osso, e ficou conhecida como cimento ósseo.	25
Figura 6. Representação da metodologia de precipitação das partículas Ca-Sr-HA.	35
Figura 7. Preparo de cimento ósseo poroso à base de PMMA. Os componentes sólidos foram inicialmente homogeneizados e em seguida foi adicionado o agente polimerizante formando uma massa (tempo 0). No terceiro minuto água foi adicionada a mistura e no quarto minuto realizou-se a transferência desta para o molde de teflon. Passados cinco minutos o molde foi fechado, permitindo o enrijecimento da mistura com o tempo. As amostras foram retiradas dos moldes após 48 horas.	39
Figura 8. Imagem da peça cilíndrica obtida após usinagem em moeda (5 mm de altura e 12 mm de diâmetro).	41
Figura 9. Padrão de DRX da série de partículas Ca-Sr-HA (0-100% Sr^{2+}) sem tratamento térmico. Os picos de difração da amostra 0% Sr^{2+} estão relacionados com o padrão (●) AMCS D 0002281 para HA pura. Ao aumentar a quantidade de Sr^{2+} pode-se observar a formação de partículas amorfas (10-50% Sr^{2+}). A partir de 70% Sr^{2+} nota-se o aparecimento de picos de difração, sendo estes relacionados à estroncianita (■) AMCS D 0000234 para 70% Sr^{2+} e uma mistura dessa fase com estrôncio apatita (▲) COD 9011132 para as amostras 90 e 100% Sr^{2+}	46
Figura 10. Espectro FTIR das partículas (0-100% Sr^{2+}) antes do tratamento térmico evidenciando bandas de absorção típicas relacionadas aos grupos PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , OH^- e moléculas de H_2O . A diminuição na definição das bandas do grupo PO_4^{3-} a partir de 10% Sr^{2+} e posterior reaparecimento em 90% Sr^{2+} é notória, o que corrobora com os resultados obtidos por DRX. (○) indica o modo ν_2 do grupo fosfato para 0% Sr^{2+}	49
Figura 11. Padrão de DRX da série de partículas Ca-Sr-HA (0-100% Sr^{2+}) após tratamento térmico (600°C por 8h). Os picos de difração da amostra 0% Sr^{2+} estão relacionados com o padrão (●) AMCS D 0002281 para HA pura. O aumento da quantidade de íons Sr^{2+} levou à formação de uma fase pura de estrôncio apatita (SrA) (▲) COD 9011132 como mostrado para 100% Sr^{2+} . Mistura de fases HA e SrA são observadas para a série (10-50% Sr^{2+}) com conversão total para SrA a partir de 70% Sr^{2+} . A linha tracejada indica o deslocamento da reflexão de Bragg (002) para menores valores de θ com o aumento da quantidade de Sr^{2+}	50
Figura 12. Efeitos ocasionados pela introdução de íons Sr^{2+} na estrutura cristalina das partículas tratadas termicamente (0-100% Sr^{2+}). (a) Deslocamento linear da reflexão de Bragg (002) com o aumento da porcentagem molar de Sr^{2+} , indicando um aumento da distância interplanar (d) e dos parâmetros de rede. (b) Razão c/a confirmando o aumento linear e anisotrópico de c (Å) em relação ao parâmetro a (Å).	51
Figura 13. Espectro FTIR das partículas (0-100% Sr^{2+}) após tratamento térmico evidenciando bandas de absorção típicas relacionadas aos grupos PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , OH^- e moléculas de H_2O	53
Figura 14. (a) Vista da célula unitária hexagonal de HA quando projetada no plano horizontal. (b) Sítios Ca(II) localizados ao redor de canais de grupo hidroxila no eixo-c formando triângulos de cálcio. (c) A substituição de íons Ca por Sr^{2+} na posição Ca(II) é responsável por aumentar a célula unitária ao longo do eixo-c e diminuir a densidade espacial das ligações OH, o que conduz ao decréscimo da intensidade das bandas relacionadas a este grupo com o aumento da porcentagem molar de Sr^{2+}	55
Figura 15. Deslocamento linear dos modos vibracionais (a) ν_1 e (b) ν_4 do grupo PO_4 com o aumento da porcentagem molar de Sr^{2+} , em conformidade com os resultados apresentados por DRX.	55
Figura 16. Imagens de MEV da série de partículas Ca-Sr-HA tratadas termicamente. Morfologias esféricas puderam ser observadas para todas as porcentagens molares de Sr^{2+}	57
Figura 17. Temperatura máxima de polimerização dos cimentos. Valores na faixa de 42,0 a 68,4°C foram encontrados, respeitando a especificação estabelecida pela ISO 5833 (< 90°C), como mostrado pela linha tracejada em vermelho. (* mostra diferença significativa em relação ao controle; $p < 0.05$).	63

Figura 18. (a) Tempo de pega e (b) tempo de cura médio dos cimentos ósseos controle e os demais contendo Ca-Sr-HA. As linhas tracejadas indicam as normas recomendadas pela ISO 5833.	64
Figura 19. Imagens de MEV para as amostras 10 e 50 % Sr^{2+} . As setas em vermelho indicam poros menores no interior de poros maiores, confirmando a criação de uma matriz porosa interconectada.	66
Figura 20. Imagens de MEV para as amostras controle, 30% Sr^{2+} e 90% Sr^{2+} . (a) ampliação x60; (b) ampliação x350 e (c) ampliação x1500.	66
Figura 21. Imagens de MEV da amostra 10% Sr^{2+} . (a) ampliação x60; (b) ampliação x350; e (c) ampliação x350 evidenciando a presença de partículas na superfície dos poros (imagem colorida artificialmente).	67
Figura 22. Espectro de DRX das amostras controle, 10% Sr^{2+} e 100% Sr^{2+} . Uma região amorfa e picos correspondentes a sulfato de bário (●) foram observados para todas as amostras analisadas. Os cimentos carregados com Ca-Sr-HA não evidenciaram os picos característicos destas partículas, como resultado da pequena quantidade de Ca-Sr-HA em comparação a de BaSO_4 .	68
Figura 23. Espectros de EDS obtidos para três regiões diferentes selecionadas na amostra 50% Sr^{2+} . (a) Espectro da região 1 apresentando basicamente os elementos C e O característicos do PMMA; (b) espectro da região 2 constituído majoritariamente por C, O, Ba e S indicando a presença de BaSO_4 e formação de nova matriz de PMMA; e (c) espectro da região 3 mostrando sinal intenso de Na.	69
Figura 24. Análise da composição elementar da amostra 10% Sr^{2+} . (a) Mapeamento elementar evidenciando a presença de partículas Ca-Sr-HA impregnadas na matriz polimérica; e (b) espectro elementar com sinais mais intensos para Ca em relação a Sr confirmando a natureza desta partícula.	70
Figura 25. Análise da composição elementar da amostra 90% Sr^{2+} . (a) Mapeamento elementar evidenciando a presença de partículas Ca-Sr-HA na superfície dos poros (região escura); e (b) espectro elementar com sinais mais intensos para Sr em relação a Ca confirmando a natureza desta partícula.	71
Figura 26. Alteração do pH do meio de cultura (α -MEM) durante o período de 72 horas devido à imersão da amostra controle e as demais contendo Ca-Sr-HA.	72
Figura 27. Parâmetros morfométricos obtidos para as amostras de cimento ósseo controle e as demais contendo Ca-Sr-HA, onde (a) CV/TV (%) é a fração do volume do cimento ósseo em porcentagem; (b) é a porosidade total (%) do material; (c) CS/CV (1/mm) é a superfície de cimento específica; (d) é o tamanho médio dos poros (μm); e (e) % de poros abertos e fechados. (*, **, ***, **** mostram diferença significativa em relação ao controle, onde $p < 0.05$; < 0.01 ; < 0.001 e < 0.0001 , respectivamente).	74
Figura 28. Porcentagem de distribuição (ou frequência) dos tamanhos dos poros nas amostras de cimentos controle e as demais contendo Ca-Sr-HA.	76
Figura 29. Seções transversais representativas das amostras escaneadas por micro-CT, onde (a) controle; (b) 10% Sr^{2+} ; (c) 30% Sr^{2+} ; (d) 50% Sr^{2+} ; (e) 70% Sr^{2+} ; (f) 90% Sr^{2+} ; e (g) 100% Sr^{2+} . As setas vermelhas indicam a presença das partículas na matriz do cimento ósseo.	79
Figura 30. Reconstruções 3D representativas das amostras, onde (a) controle; (b) 10% Sr^{2+} ; (c) 30% Sr^{2+} ; (d) 50% Sr^{2+} ; (e) 70% Sr^{2+} ; (f) 90% Sr^{2+} ; e (g) 100% Sr^{2+} .	80
Figura 31. Propriedades mecânicas dos cimentos ósseos. (a) módulo de Young (MPa) e (b) tensão máxima compressiva (MPa). (*, **, ***, **** mostram diferença significativa em relação ao controle, onde $p < 0.05$; < 0.01 ; < 0.001 e < 0.0001 , respectivamente).	82
Figura 32. Processo de liberação de partículas em matrizes porosas. Inicialmente, uma liberação rápida de partículas presentes nas regiões mais externas é evidenciada. Em seguida, nota-se uma liberação intermediária dependente das propriedades dos poros. Ao fim, um platô é atingido e a liberação é controlada pelas partículas mais internas. (Imagem adaptada da referência 56).	84

Figura 33. Perfil de liberação de íons Sr^{2+} das amostras de cimentos contendo Ca-Sr-HA imersas em: (a) tampão PBS e (b) α -MEM, por um período de 336 horas.	85
Figura 34. Perfil de liberação de íons Ca^{2+} das amostras de cimentos contendo Ca-Sr-HA imersas em α -MEM por um período de 72 horas.	87
Figura 35. Espectro FTIR da amostra de cimento controle e as demais contendo Ca-Sr-HA previamente à exposição ao SBF. Bandas características do polímero são observadas para todas as amostras comprovando que a introdução das partículas Ca-Sr-HA não provocou mudanças químicas no PMMA.	88
Figura 36. Espectro FTIR da amostra de cimento controle e as demais contendo Ca-Sr-HA após exposição ao SBF por 28 dias. Decréscimo na intensidade das bandas do PMMA e aumento da intensidade da banda correspondente ao modo vibracional ν_3 do grupo fosfato pode ser observada para todas as amostras, indicando a deposição de apatita na superfície dos materiais.	89
Figura 37. Porcentagem da razão das intensidades relativas das bandas de absorção no infravermelho referentes ao grupo PO_4^{3-} (1070 cm^{-1}) e C=O (1730 cm^{-1}) para os cimentos contendo Ca-Sr-HA em relação ao cimento controle.	90
Figura 38. Imagens de MEV da amostra 10% Sr^{2+} após exposição ao SBF durante 28 dias. (a) ampliação x60; (b) ampliação x350; (c) ampliação x1500; (d) ampliação x3000; (e) ampliação x4000; e (f) ampliação x5000.	91
Figura 39. Mapeamento e espectro elementar da amostra 10% Sr^{2+} após exposição à SBF. (a) Mapeamento elementar evidenciando precipitação de apatita na superfície do cimento ósseo; e (b) espectro elementar com sinais mais intensos para C, P e O.	92
Figura 40. Viabilidade celular (%) em relação ao cimento de PMMA sem partículas (controle) medida pelo teste de MTT após 72 horas (preto) e 7 dias (cinza). (* mostra diferença estatística em relação ao controle, onde $p < 0.05$).	93

Índice de tabelas

Tabela 1. Posição (graus) e distância interplanar d (nm) correspondentes aos índices de Miller (002) e (310), tamanho do cristalito D_{hkl} (nm) e parâmetros de rede da célula unitária para as diferentes porcentagens molares de Sr^{2+} das partículas Ca-Sr-HA.....	52
Tabela 2. Porcentagem (%) molar de Sr^{2+} incorporada nos sólidos finais tratados termicamente em contraste com a porcentagem (%) molar presente na solução preparada, conforme determinado por EDS.	56
Tabela 3. Tamanho (nm) das partículas Ca-Sr-HA tratadas termicamente investigado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz.....	58
Tabela 4. Ângulo de contato da água (θ), energia livre de superfície (γ_s) e suas componentes polar (γ^p) e dispersiva (γ^d), e potencial zeta (ζ) das partículas Ca-Sr-HA tratadas termicamente.	60
Tabela 5. Porcentagem (%) de Sr^{2+} liberado em função do tempo em PBS e α -MEM em relação a quantidade inicial (1 wt%) presente nas amostras de cimento.....	86
Tabela 6. Razão entre as intensidades relativas das bandas de absorção no infravermelho referentes ao grupo PO_4^{3-} (1070 cm^{-1}) e C=O (1730 cm^{-1}) apresentadas nos espectros das amostras antes e após o SBF.....	90

Siglas e Abreviaturas

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
ATR	Reflectância Total Atenuada
Ca-Sr-HA	Hidroxiapatita substituída por Sr ²⁺
CaP	Fosfato de cálcio
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DRX	Difração de Raios-X
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva por raios-X
ELS	Energia livre de superfície
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier
γ	Tensão Superficial
HA	Hidroxiapatita
ISO	Organização Internacional de Normalização
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Micro-CT	Microtomografia Computadorizada
MMA	Metilmetacrilato
MTT	3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo
PBS	Tampão fosfato (<i>phosphate buffer solution</i> , do inglês)
PMMA	Polimetilmetacrilato
SBF	Fluido Corpóreo Simulado
SrA	Estrôncio apatita
ζ	Zeta

Introdução

1.1. Entendendo a natureza do tecido ósseo

As hélices da vida: o tecido ósseo como uma estrutura fractal.

Ao longo da evolução, a natureza encontrou as organizações estruturais mais adequadas para obtenção de melhores propriedades biológicas¹. Nesse sentido, o tecido ósseo desperta grande interesse devido à sua sofisticada estrutura hierárquica em diversas escalas de comprimento (nano-, micro-, mili- e centímetro)² e sua composição química otimizada responsáveis por suas excepcionais propriedades mecânicas. Embora longe de ser totalmente entendido, o estado atual de conhecimento deste tecido revela pelo menos 12 diferentes níveis de organização³, onde o bloco construtor elementar são fibrilas de colágeno mineralizadas^{4,5}.

Em nível molecular, o colágeno possui uma estrutura de tripla hélice com sentido direito, composta por três cadeias polipeptídicas, duas $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$, cada uma formada por uma sequência repetitiva de aminoácidos (Gly-X-Y)_n, onde as posições X e Y são ocupadas principalmente por prolina e hidroxiprolina⁶⁻⁹. O empacotamento repetido e escalonado de 5 macromoléculas de colágeno ao longo do eixo de suas hélices origina estruturas supramoleculares tipo-helicoidal, nomeadas microfibrilas, que se interdigitam com estruturas vizinhas semelhantes formando as fibrilas⁹⁻¹¹. Este escalonamento molecular exterioriza um padrão específico de bandas nas fibrilas, com uma região mais densa de 27 nm denominada *overlap* e uma menos densa de 40 nm dita como região de *gap*, sendo esta última conhecida pela nucleação de fases amorfas precursoras do mineral ósseo mesmo na presença de inibidores^{12,13}.

A hierarquia em escala sub-micrométrica não é exclusiva para o colágeno e também ocorre no mineral ósseo³. A observação do conjunto cristalino formado por este mineral em diferentes projeções é marcada por três diferentes padrões: (i) um padrão filamentosos (*filamentous motif*, do inglês) originado pelos cristais levemente curvados e alinhados com o longo eixo das fibrilas de colágeno, apresentando mais de 100 nm de comprimento^{3,14}; (ii) um padrão rendado (*lacy motif*) originado pelos cristais em paralelo, os quais possuem 5 nm de espessura e se encontram concentricamente curvados em torno de espaços vazios de 30 a 50 nm^{3,14}; e (iii) um padrão denso na forma de rosetas (*rosette motif*) originado pelo arranjo dos cristais em hélice orientada à esquerda³. A reconstrução tomográfica mostrou que esses três padrões são projeções da mesma estrutura tridimensional do mineral na matriz, onde a

entidade básica são partículas aciculares curvadas que se agregam lateralmente formando estruturas ainda maiores do tipo plaquetas, as quais podem apresentar uma leve rotação em relação ao seu eixo longitudinal ou formar pilhas características de 2 a 4 plaquetas. As próprias plaquetas ou seus agregados convergem formando superestruturas policristalinas, as quais excedem as dimensões laterais de uma fibrila de colágeno. Em vista disso, a mineralização não é mais dita como intrafibrilar ou extrafibrilar, mas sim descrita como uma mineralização contínua³.

Figura 1. Morfologia e organização dos cristais do mineral ósseo na matriz óssea vista em diferentes orientações. A primeira coluna mostra a orientação das seções em relação a matriz. As colunas do meio mostram imagens de microscopia das seções realizadas. A terceira coluna esquematiza o modelo 3D do mineral ósseo visto nas diferentes projeções. (Imagem adaptada da referência 3).

O produto final (fibrila mineralizada) forma matrizes com diferentes graus de isotropia através do alinhamento das fibrilas de colágeno mineralizadas (padrão ordenado)¹⁵ ou sua desordem (padrão desordenado)^{16,17}. Especificamente, o material ordenado origina super-estruturas na forma de feixes cilíndricos de até 3 μm que se auto-organizam paralelamente em camadas com ordem orientacional^{15,16}. Cada camada se empilha com diferente orientação dos feixes cilíndricos em relação à anterior (chamado de *plywood structure*, do inglês)¹⁵⁻¹⁷ e o material desordenado preenche os espaços entre os feixes e as

camadas vizinhas como uma fase contínua¹⁶. Ainda, as lacunas e os canalículos dos osteócitos se encontram localizados exclusivamente no material desordenado^{4,16}. Essa é a base das lamelas do tecido ósseo lamelar. Tridimensionalmente, uma única lamela apresenta de 3 a 7 μm de finura e é constituída por sub-lamelas contendo as camadas de feixes cilíndricos¹⁶.

Em maior hierarquia, essas lamelas se organizam em ósteons ou pacotes lamelares dependendo do tipo ósseo e função. Nesse sentido, os pacotes lamelares são arranjos semi-circulares de lamelas que tridimensionalmente originam as trabéculas características do osso trabecular¹⁸. Nessa estrutura, as fibrilas de colágeno ordenadas presentes nas lamelas se encontram em duas orientações preferenciais: orientadas com o longo eixo da trabécula e deslocadas deste eixo por volta de 30-40° ou 60-70°. Essa orientação reflete a organização das trabéculas em nível hierárquico maior, resultando em um ângulo médio entre as trabéculas de 30-40° ou 60-70°¹⁹.

Por sua vez, os ósteons (100 a 200 μm) representam a unidade estrutural majoritária do tecido cortical e são constituídos de lamelas concêntricas ao redor de um canal de Haversian com vasos sanguíneos^{17,18,20}. Em contraste aos pacotes lamelares, nesta estrutura as fibrilas de colágeno ordenadas coexistem em dois tipos de arranjos através das lamelas, onde: (i) as fibrilas de colágeno oscilam suavemente em relação ao eixo longo do ósteon (referido como *oscilating plywood*, do inglês)^{17,21}; e (ii) rotacionam em um ângulo constante em relação ao plano da camada vizinha gerando uma estrutura em hélice (referido como *twisted plywood*, do inglês)^{17,21,22}. Este último arranjo é resultado da organização cristal líquido colestérica do colágeno^{6,22}. De fato, ao realizar um corte perpendicular ao eixo da estrutura em hélice pode-se observar uma ordem nemática local, onde as fibrilas de colágeno não apresentam ordem posicional, entretanto, possuem ordem direcional de longo alcance⁶. Por outro lado, ao realizar um corte oblíquo em relação ao arranjo colestérico, um artefato visual de padrão arqueado é notável^{6,22}. O arranjo colestérico é responsável pelo caráter anisotrópico das propriedades mecânicas do osso nesta escala, as quais variam de acordo com a direção de carga aplicada²³. De modo interessante, os próprios ósteons se inclinam em relação ao eixo longo do osso originando sistemas helicoidais de baixo passo como resultado de uma adaptação a carga^{24,25}.

Figura 2. (a) Visão lateral das fibrilas de colágeno no arranjo referido como *oscillating plywood* nos ósteons: as fibrilas realizam uma oscilação sinusoidal entre 0 e 30°; (b) visão lateral das fibrilas de colágeno no arranjo referido como *twisted plywood* nos ósteons: as fibrilas rotacionam em ângulo constante em relação as vizinhas; (c) estrutura helicoidal de um cristal líquido colestérico; (d) e (e) corte oblíquo mostrando um artefato visual arqueado como resultado da estrutura nomeada *twisted plywood* e (f) esquema da orientação helicoidal de um ósteon (tracejado mais escuro) na tíbia. (Imagem adaptada das referências: a e b²¹; c e d⁶, e²², f²⁵).

Por fim, em nível macroscópico, os diversos ossos do esqueleto são formados por diferentes razões de osso cortical e trabecular²⁶, onde o primeiro atua como uma camada externa e o último pode atuar preenchendo o volume interno de alguns ossos, como nas vertebrae, ou estar presente em apenas algumas partes, como nos ossos longos⁴. De maneira surpreendente, o tema helicoidal continua sendo observado nesse nível hierárquico, como exemplificado pelos sulcos e tuberosidade no eixo do úmero e pelas curvaturas da costela e da clavícula³.

Esse estudo dos diferentes níveis de organização da estrutura óssea (Figura 3) esclarece que o padrão helicoidal ou torcido está presente em todos os níveis hierárquicos do osso, indicando que este tecido apresenta uma estrutura fractal, ou seja, estruturas menores se assemelham com as maiores ou com o osso como um todo³. Adicionalmente, esse padrão explica a combinação engenhosa de rigidez e tenacidade do tecido ósseo³, as quais exercem papel fundamental em suas funções, especificamente na proteção de estruturas vitais, resistência ao impacto, apoio e alavancagem de músculos^{5,18}.

Figura 3. Esquema dos 12 níveis de organização hierárquica do tecido ósseo. Os ossos como um todo (XII) são compostos por diferentes razões de osso compacto (denso) e trabecular (poroso) (XI). Em mamíferos, o osso compacto e trabecular são geralmente constituídos por osso lamelar, onde as lamelas encontram-se organizadas em ósteons e pacotes lamelares (X), respectivamente. As lamelas (IX) são formadas pelo empilhamento em diferentes orientações de camadas de feixes cilíndricos paralelos (verde), onde um material desordenado (azul) separa as camadas e os feixes vizinhos, como uma fase contínua. Os feixes cilíndricos (VIII) são super-estruturas originadas pela organização das fibrilas de colágeno mineralizadas (padrão ordenado). Similarmente, o material desordenado é formado por fibrilas de colágeno mineralizadas (VI), porém em um padrão desordenado (VII). As fibrilas de colágeno surgem através do empacotamento de microfibrilas (V), as quais são compostas por triplas-hélices de colágeno (IV) escalonadas, que por sua vez são formadas por cadeias peptídicas (III) com uma sequência repetitiva de aminoácidos (II). O componente inorgânico das fibrilas de colágeno mineralizadas (VI) também apresenta diferentes níveis de organização, sendo eles: agregados de mineral (V), pilhas de plaquetas (IV), plaquetas (III) e cristais aciculares (II). (Imagem adaptada da referência 3).

A surpreendente ação celular na formação de um tecido dinâmico.

Apesar de aparentemente inerte, o osso está em constante processo de remodelação através de um equilíbrio coordenado entre os processos de reabsorção e formação óssea²⁷. Esta dinâmica é fundamental no reparo de pequenos danos, renovação do esqueleto e manutenção da integridade mecânica²⁸.

O balanço necessário para a remodelação óssea está relacionado com a regulação na atividade de duas células principais: os osteoclastos e osteoblastos²⁹. Os primeiros são grandes células multinucleadas de origem hematopoiética responsáveis pela reabsorção da matriz óssea calcificada em resposta a sinais físicos e hormonais. A formação dos osteoclastos (osteoclastogênese) é um processo complexo que envolve principalmente o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) e o sistema regulador RANK/RANKL/OPG³⁰, onde RANK é o receptor ativador do fator nuclear kappa B, RANKL é seu ligante e OPG é osteoprotegerina. O M-CSF se liga ao receptor de membrana c-Fms ativando diferentes vias de sinalização responsáveis pela proliferação e sobrevivência dos precursores osteoclásticos³¹. Por sua vez, o RANK é um receptor da superfamília TNF (fator de necrose tumoral) que se encontra na membrana dos precursores e dos osteoclastos diferenciados³⁰. A interação de RANKL com este receptor é crucial para o processo de osteoclastogênese, promovendo a diferenciação dos precursores osteoclásticos e a ativação do processo de reabsorção pelos osteoclastos maduros³¹. A inibição da osteoclastogênese e o controle da reabsorção pode ser mediado por OPG, que devido à sua alta afinidade por RANKL previne a interação RANK/RANKL^{30,32}. Grande parte da produção de M-CSF, RANKL e OPG no microambiente ósseo é realizada por células osteoprogenitoras e osteoblastos maduros³⁰⁻³². O osteoclasto ativo inicia o processo de reabsorção da matriz óssea mineralizada através da formação de um compartimento fechado na área a ser degradada, onde são liberados prótons e enzimas proteolíticas responsáveis pela dissolução dos minerais ósseos e degradação da matriz orgânica, respectivamente^{31,33}.

Por sua vez, os osteoblastos são derivados de células-tronco mesenquimais e possuem papel fundamental na formação óssea através da síntese de matriz orgânica (osteóide) e posterior mineralização³⁴. Em princípio, o fator de transcrição *Runx2* é responsável por direcionar as células mesenquimais para linhagem osteoblástica e inibir as

demais^{27,35}. Os pré-osteoblastos expressam alguns marcadores específicos desta linhagem, entretanto, ainda não possuem habilidade de produzir matriz óssea³⁴. O desenvolvimento fenotípico dos osteoblastos passa por diferentes estágios até culminar nos osteoblastos maduros. Estes estágios podem ser classificados em: (i) proliferação celular e produção de matriz extracelular (MEC); (ii) desenvolvimento, organização e maturação da MEC; e por fim (iii) mineralização³⁶. Cada etapa está relacionada com a expressão de marcadores específicos do processo de diferenciação celular, formação e mineralização da matriz. O primeiro estágio é marcado pela alta atividade mitótica relacionada com o processo de proliferação celular. Ainda, a expressão de componentes básicos da matriz, como o colágeno tipo I, também é observada. Em etapa posterior, aumento de atividade da enzima fosfatase alcalina é notável, a qual está associada com a hidrólise de fosfatos orgânicos e disponibilização de íons fósforos livres, os quais são importantes para o processo de mineralização. O início da mineralização está associado com a expressão de proteínas não-colagenosas, especificamente a osteopontina e osteocalcina. Embora o mecanismo de ação destas proteínas ainda não tenha sido desvendado, estudos vêm mostrando que elas apresentam papel importante no processo de mineralização. Ratos que possuem o gene da osteopontina inativo apresentam uma razão mineral/osso menor, por sua vez, a inativação do gene da osteocalcina afeta o crescimento dos cristais de apatita³⁷.

Ao fim do processo de síntese da matriz mineralizada os osteoblastos podem seguir três destinos distintos: (i) ser embebidos na matriz óssea como osteócitos; (ii) ser transformados em osteoblastos inativos de superfície, nomeados células de revestimento ósseo; e (iii) sofrer apoptose³⁸.

Diversos fatores, sistêmicos ou locais, são responsáveis pelo controle das atividades dos osteoclastos e osteoblastos, como os mediadores inflamatórios (citocinas), fatores de crescimento e hormônios³⁹. Alterações nestes fatores podem resultar em diferentes distúrbios, dentre eles a osteoporose, onde o processo de reabsorção é maior do que o de formação óssea, conduzindo na perda de massa, deterioração da microarquitetura deste tecido, e consequentemente, um aumento da fragilidade e risco de fraturas.

Figura 4. Representação das diferentes células presentes no tecido ósseo. Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas de células-tronco hematopoiéticas, responsáveis pela reabsorção da matriz óssea mineralizada. Por sua vez, os osteoblastos são derivados de células-tronco mesenquimais e atuam no processo de formação óssea. Ao fim da produção da matriz mineralizada, os osteoblastos podem ser embutidos na matriz óssea como osteócitos, ser transformados em células de revestimento ou sofrer apoptose (Imagem adaptada da referência 29).

1.2. O osso: uma fonte de inspiração na fabricação de biomateriais

Embora a natureza do tecido ósseo permita que ele se autorregenere curando pequenas fraturas, algumas patologias congênitas e adquiridas, como traumas, tumores e deformidades, culminam em defeitos ósseos de tamanhos críticos que o corpo por si só não consegue reparar, tornando-se necessária a realização de intervenção cirúrgica⁴⁰. A demanda por procedimentos ortopédicos decorrente dessas patologias e do maior envelhecimento populacional tem crescido, e nesse sentido, o campo dos biomateriais deve acompanhar por meio de materiais com melhores respostas biológicas após a implantação²⁰. De um modo geral, os biomateriais devem apresentar alto grau de biocompatibilidade, com respostas adversas praticamente desprezíveis^{40,41}.

O sucesso do biomaterial está intimamente relacionado com a formação de uma interface biomaterial-osso, como resultado de diferentes mecanismos biológicos do processo de cicatrização. Após implantado, ele deve ser capaz de recrutar células precursoras do tecido hospedeiro e estimular sua diferenciação em células osteogênicas, dando início a osteogênese. Esta habilidade é chamada osteoindução. Ainda, o material deve ser osteocondutor, promovendo a formação óssea em sua superfície pelas células diferenciadas e osteoblastos pré-existentes. Os processos de osteoindução e osteocondução

culminam na osteointegração do implante, a qual possui importância crítica em termos de promover regeneração óssea funcional^{42,43}.

Em geral, a osteointegração de um biomaterial ao osso depende fundamentalmente de suas propriedades superficiais, as quais possuem papel crítico no controle das interações biomaterial-célula. Quando um biomaterial entra em contato com o sangue, as proteínas do plasma adsorvem em sua superfície. Essa etapa aparenta ser a mais relevante de todo o processo, uma vez que a adesão celular ocorre na verdade na camada de proteínas, e não na superfície do material propriamente dito. Nesse sentido, o tipo de proteína adsorvida pode ditar a resposta celular e consequentemente todo o processo de osteointegração. Especificamente, as proteínas fibronectina e vitronectina apresentam uma sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD) que é reconhecida pelos receptores transmembrana integrina⁴⁴, conduzindo ao recrutamento inicial de células. Este receptor conecta o citoesqueleto das células na matriz extracelular, formando adesões focais. A adesão celular mediada por integrinas ativa uma cascata de vias de sinalização afetando a morfologia, proliferação e diferenciação das células⁴³.

Como a maior parte dos eventos descritos anteriormente ocorre na superfície dos materiais, propriedades superficiais como energia livre de superfície, carga superficial, composição química e topografia podem ser manipuladas a favor de melhor osteointegração⁴⁵. A imobilização de biomoléculas naturais na superfície dos biomateriais vêm sendo uma alternativa corriqueira de melhorar as propriedades do material e mimetizar a matriz extracelular⁴⁶. Dentre essas biomoléculas encontram-se colágeno⁴⁷, pequenas sequências peptídicas como RGD⁴⁸, fatores de crescimento⁴⁹, entre outras. Destaque tem sido dado na manipulação da composição química com fosfatos de cálcio devido à semelhança deste mineral com a apatita biológica, abrindo possibilidade de se mimetizar a composição química do tecido ósseo. Ainda, estes minerais são capazes de aumentar a hidrofilicidade dos materiais, permitindo melhor molhabilidade e adsorção de proteínas e células *in vivo*.

Outros fatores além dos já citados também são responsáveis por controlar as interações células-biomateriais, como por exemplo, as propriedades mecânicas. O papel desta propriedade vai além de fornecer resistência para o produto final implantado, estando também intimamente relacionado com o processo de diferenciação celular. O cultivo de células tronco-mesenquimais em matrizes de diferentes rigidezes está associado ao

comprometimento de diferentes linhagens celulares⁵⁰. Em parte, este processo está relacionado com as adesões focais, as quais são responsáveis pela transmissão do sinal extracelular biofísico para o meio intracelular, como um sinal bioquímico. A variação das adesões focais em matrizes de diferentes rigidezes resulta na proliferação, espalhamento e diferenciação celular de diferentes linhagens⁵¹. Outros mecanismos de mecanotransdução também atuam neste processo⁴³. Nesse contexto, materiais que mimetizem as propriedades mecânicas do osso são capazes de regular a osteogênese. Ainda, é sabido que implantes com rigidez maior que o osso são capazes de diminuir o estímulo mecânico recebido por este tecido, conduzindo a uma diminuição na densidade e na arquitetura óssea, o que resulta em um osso mais frágil (processo nomeado *stress shielding*, do inglês)⁵². Em vista disso, a criação de uma matriz com propriedades mecânicas semelhantes ao osso diminui as chances de falha do implante por *stress shielding*⁵³.

A habilidade osteoindutora dos biomateriais também está intimamente relacionada com a presença de poros na superfície e no *bulk*⁴³. Uma estrutura porosa fornece a microarquitetura necessária para chegada de suprimentos celulares, população do biomaterial e vascularização, a qual é de extrema importância no processo de osteointegração⁴². A estrutura do material atua como um molde para a deposição de matriz pelos osteoblastos, levando ao contato íntimo entre o osso formado e o implante. O osso apresenta diferentes tamanhos de poros que vão de 1 μm até várias centenas de micrometros. Cada poro apresenta uma função específica, onde os poros menores que 1 μm interagem com proteínas, os menores que 20 μm são necessários para o crescimento de capilaridades e interações matriz-células e aqueles maiores que 150 a 400 μm , estão envolvidos com o processo de colonização e vascularização¹. Assim, ao criar um biomaterial a porosidade hierárquica deve ser reproduzida visando aperfeiçoar o processo de regeneração. O tamanho dos poros não é a única variável que tem implicação direta na funcionalidade dos biomateriais, sendo a interconectividade destes diretamente relacionada com o aumento na proliferação e viabilidade celular em culturas *in vitro*⁵⁴.

A criação de biomateriais com estruturas altamente porosas confere a habilidade de hospedar substâncias bioativas e medicamentos para o aperfeiçoamento da regeneração óssea e tratamento de patologias, como osteoporose, tumores e doenças inflamatórias^{1,46}. A administração sistêmica de fármacos está associada com a distribuição destas substâncias pelo corpo através da corrente sanguínea, tornando baixa a penetração no tecido desejado

e trazendo a possibilidade de toxicidade sistêmica⁵⁵. Em contraste, a possibilidade de biomateriais liberarem fármacos localmente traz grandes avanços no que concerne a diminuição da concentração plasmática dos medicamentos e das chances de efeitos adversos. Ainda, esse tipo de administração garante mais facilmente a dose terapêutica no local de tratamento da patologia^{55,56}. Além das vantagens proporcionadas pela liberação no local de implantação, os biomateriais também podem estar relacionados com uma liberação controlada, o que indica que as substâncias são liberadas com uma taxa específica e por um período de tempo determinado. A taxa e a maneira como as substâncias são liberadas dependem diretamente da matriz (isto é, porosidade, área superficial específica e permeabilidade), da substância (tipo, quantidade e solubilidade) e das interações matriz-substância⁵⁵⁻⁵⁷. Assim, esta estratégia traz a possibilidade de projetar os biomateriais não somente como guias para formação óssea, mas também como sistemas de liberação local controlada.

Historicamente, os metais e suas ligas são considerados como padrão na fabricação de implantes em ortopedia devido à resistência a fadiga e estabilidade mecânica logo após a implantação⁵⁸. Entretanto, a ineficiente osteointegração deste tipo de material ao osso leva à busca por biomateriais com melhores propriedades. Nesse sentido, cerâmicas bioativas, polímeros e compósitos destes dois surgem como alternativa. As cerâmicas são tipicamente materiais inorgânicos, como fosfatos de cálcio e os vidros bioativos, bem conhecidos por suas excelentes propriedades osteocondutoras, habilidade de se ligar diretamente ao osso e capacidade de melhorar o crescimento e diferenciação de osteoblastos. Parte das suas vantagens estão relacionadas com a natureza química semelhante ao mineral ósseo. Entretanto, apesar de suas ótimas propriedades biológicas, a natureza frágil deste material dificulta seu uso em aplicações de suporte de carga⁵⁹⁻⁶¹. Materiais poliméricos são uma categoria interessante que têm grande destaque devido a capacidade de se criar biomateriais com diferentes formas, permeabilidade, rigidez e porosidade. Polímeros naturais como colágeno, quitosana, ácido hialurônico e alginato são biologicamente ativos e conduzem adesão e crescimento celular. A biodegradabilidade dos polímeros naturais permite que as células produzam sua própria matriz extracelular para substituir o polímero degradado. Apesar das vantagens citadas anteriormente, a taxa de degradação destes polímeros é de difícil controle, suas propriedades mecânicas são pobres e existe uma inerente dificuldade em produzir estruturas reprodutivas, tornando seu uso

um desafio^{44,60,62}. Os polímeros sintéticos como poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), poliácido láctico (PLA) e polimetilmetacrilato (PMMA) são uma alternativa versátil que superam os problemas descritos para os polímeros naturais⁵⁰. Entretanto, estes ainda apresentam desvantagens como a baixa habilidade osteoindutora e bioatividade em comparação aos naturais⁶². A criação de compósitos orgânicos-inorgânicos utilizando cerâmicas e polímeros visa mimetizar o tecido ósseo e alcançar propriedades mecânicas e biológicas melhoradas⁴⁴. Esses materiais vêm alcançando sucesso no processo de regeneração óssea e ultrapassam as propriedades de seus constituintes separados⁶².

1.3. Cimento ósseo à base de PMMA: Um antigo material no futuro

A história do PMMA teve início em 1901 com o estudo dos produtos de polimerização do ácido acrílico por Otto Rohm⁶³. Em poucos anos, Otto fundou uma empresa baseado nos resultados de sua pesquisa, a qual foi responsável pela produção deste polímero em escala industrial e sua consequente difusão no mercado. O PMMA, um polímero termoplástico proveniente da polimerização do metilmetacrilato (MMA), se tornou bem-conhecido por suas propriedades excepcionais que combinavam transparência, resistência e flexibilidade⁶⁴. Como resultado de suas características apropriadas, a primeira aplicação biomédica deste material ocorreu através da produção e reparo de dentaduras⁶⁵. Pouco tempo depois, foi descoberto que a mistura do PMMA sólido com seu monômero líquido conduzia a formação de uma massa que podia ser manipulada e moldada, chamada de resina acrílica, o que levou ao uso praticamente universal dessas resinas na fabricação de dentaduras e dentes⁶⁴. A massa formada enrijecia através da adição de peróxido de benzoíla e aquecimento da blenda a 100°C⁶⁴. Nesse procedimento, o calor atua como catalisador da formação de radicais do peróxido de benzoíla, os quais atacam a dupla ligação (C=C) do monômero formando outro radical e dando início ao processo de polimerização. As cadeias poliméricas em crescimento se propagam através da combinação com mais moléculas de MMA livres até que praticamente todo o monômero seja convertido em polímero. Conforme ocorre o aumento das cadeias, a viscosidade do material também aumenta. A reação é terminada pela união direta entre duas cadeias poliméricas com radicais livres, levando ao endurecimento/cura do material^{66,67}.

No período da Segunda Guerra Mundial este polímero foi utilizado como vidro acrílico na construção de cabines de aviões e periscópios de submarinos. Surpreendentemente, muitos pilotos tiveram seus olhos feridos por fragmentos do plástico acrílico e não apresentaram reações adversas, em constraste à maioria dos materiais, revelando a biocompatibilidade deste polímero⁶⁸. Ainda em 1943, químicos alemães evidenciaram que a adição de uma amina terciária, como a N,N-Dimetil-p-toluídina, em conjunto com o peróxido de benzoíla conduzia ao enrijecimento da massa em temperatura ambiente⁶⁴. De fato, a amina aromática atua como um ativador no processo de formação de radicais livres de peróxido de benzoíla⁶⁶. Este processo é utilizado até os dias de hoje. Essas duas descobertas levaram a uma revolução na aplicação deste material no campo biomédico nos anos seguintes. Nesse sentido, o PMMA se tornou o primeiro material plástico utilizado na produção de lentes intraoculares, as quais anteriormente eram feitas de vidros. Ainda, o processo de cranioplastia, o qual era primordialmente realizado com placas metálicas, passou a ser feito majoritariamente com resinas acrílicas, as quais se moldavam ao defeito ósseo craniano⁶⁹.

A fabricação e emprego de próteses de cabeça femoral à base de PMMA para uso em osteoartrose teve início com Scales e Harshell⁷⁰ e Judet e Judet⁷¹, em 1945 e 1951, respectivamente. Em pouco tempo, o uso do polímero excedeu a fabricação de implantes, tornando-se um material de fixação de próteses metálicas na sua forma em massa (resina acrílica), como um “rejunte”⁷⁰. A principal inovação do uso de PMMA em prótese total de quadril foi evidenciada por Charnley em 1960⁷², onde os componentes acetabulares e femorais metálicos utilizados em artroplastia foram fixados com a resina acrílica. Essa massa era capaz de melhorar a transferência de tensões locais entre o osso e a prótese metálica e preencher os espaços vazios entre estes componentes, aprimorando a fixação mecânica⁶⁴. Este tipo de aplicação não tinha como função obter adesão entre o osso e a resina, mas sim atuar puramente como um “rejunte”, no qual a substância tipo-massa endurecia com o tempo e grudava os componentes ao seu redor, por este motivo, essas resinas acrílicas passaram a ser chamadas de cimentos ósseos^{72,73}. A história do uso de PMMA como biomaterial esta resumida na Figura 5.

Figura 5. Uma breve história do cimento ósseo à base de polimetilmetacrilato. A história do PMMA se inicia em 1901 com o estudo dos produtos de polimerização do ácido acrílico por Otto Rohm. Em 1907, Otto fundou uma empresa (Rohm and Haas) que foi responsável por difundir este polímero pelo mercado. O PMMA ficou bem conhecido por suas propriedades excepcionais que combinavam transparência, rigidez e flexibilidade, e sua primeira aplicação biomédica foi na produção e reparos de dentaduras (1935). Em 1936, a empresa Kulzer descobriu que ao misturar o PMMA sólido com seu monômero líquido ocorria a formação de uma massa que enrijecia com o tempo através da adição de peróxido de benzoíla e calor. No período da Segunda Guerra Mundial, grande parte das cabines de aviões e periscópios de submarinos foram construídos com este polímero, e os pilotos que tiveram seus olhos atingidos por fragmentos deste plástico não sofreram nenhum tipo de resposta inflamatória. Este acidente comprovou a biocompatibilidade deste material, o qual passou a ser aplicado na fabricação de lentes intraoculares e em cirurgias de cranioplastia. Após este evento, a utilização deste biomaterial na fabricação de próteses com fim ortopédico aumentou, até que em 1960, John Charnley realizou uma grande inovação no campo de artroplastias pela utilização da massa de polímero na fixação de componentes metálicos. Essa massa atuava como um “rejunto” que preenchia os espaços entre a prótese e o osso, e ficou conhecida como cimento ósseo.

Embora sua descoberta e comercialização possuam longa data, o PMMA ainda é amplamente utilizado e cientificamente pesquisado em diversas áreas. Dentre a vasta gama de aplicações atuais encontram-se a fabricação de chips microfluídicos⁷⁴⁻⁷⁶, o preparo de vidros⁷⁷⁻⁷⁹, a atuação como guias de onda em aplicações fotônicas^{80,81}, o uso na fabricação de dentaduras e outras aplicações dentárias⁸²⁻⁸⁴ e a utilização como substituto ósseo. Em vista disso, o uso de cimentos ósseos à base de PMMA nos campos da odontologia e ortopedia não parou no tempo, e continua sendo intensamente pesquisado, datando mais de 50 anos.

Em ortopedia, além do uso clássico em fixação de próteses, os cimentos ósseos à base de PMMA são amplamente empregados em vertebroplastia, como um procedimento minimamente invasivo no tratamento de fraturas por compressão vertebral decorrentes de osteoporose e tumores^{85,86}. Esse procedimento consiste no uso de uma agulha para distribuir o cimento ósseo na região da vertebra fraturada e resulta no alívio imediato das dores dos pacientes como resultado da imobilização do corpo vertebral⁸⁶. Uma variação da vertebroplastia, a cifoplastia, além de diminuir as dores restaura a altura do corpo vertebral melhorando a qualidade de vida dos pacientes. O cimento ósseo à base de PMMA é utilizado como padrão nesses procedimentos uma vez que é um material de autocura, sendo capaz de ser aplicado por agulhas em seu estado fluido e enrijecer no local para fornecer suporte as vertebra⁸⁵. Além deste procedimento clínico, os cimentos ósseos à base de PMMA também são muito utilizados na substituição de osso de má qualidade (como na osteoporose) e no preenchimento de pequenos defeitos ósseos por trauma ou ressecção tumoral.

Especificamente, o tumor de células gigantes é uma neoplasia óssea primária de origem mesenquimal que se apresenta comumente como uma lesão benigna, porém muitas vezes agressiva, localizada na região metafisária dos ossos longos^{87,88}. No tratamento destes tumores ósseos benignos, a estratégia mais aceita é a realização inicial da técnica de curetagem objetivando erradicar completamente o tumor. Posteriormente, é realizado o uso de adjuvantes como auxiliares no processo de cura e na precaução da recorrência local. Por fim, o defeito ósseo é corrigido. Dentre os adjuvantes utilizados encontram-se a eletrocauterização, a criocauterização, o uso de fenol e a cimentação com polimetilmetacrilato. Este último se destaca em relação aos demais pois produz menor taxa de recorrências, gera estabilidade mecânica imediatamente após implantação e libera calor através de sua reação de polimerização exotérmica, auxiliando na necrose de eventuais células tumorais remanescentes do procedimento cirúrgico^{87,89}.

O uso clínico destes cimentos ósseos à base de PMMA por cirurgiões ortopédicos deve persistir ao longo do tempo devido as características deste material, como excelente biocompatibilidade⁸⁴, moldabilidade⁹⁰, capacidade de gerar estabilidade mecânica logo após implantação⁶⁴, propriedades de secagem adequadas, baixo custo⁸⁴ e rápida polimerização⁷³. Apesar de suas inúmeras vantagens como substitutos ósseos, estes cimentos estão

associados a algumas falhas que estimulam a procura por metodologias que melhorem suas propriedades.

Por exemplo, no cenário de uso deste material para fixação de próteses metálicas em artroplastia, o cimento atua em duas interfaces distintas: uma interface cimento-osso e uma cimento-implante metálico. O módulo de elasticidade do cimento (2-3 GPa) é 10 vezes menor que o do osso cortical (20 GPa) e aproximadamente 100 vezes menor do que o implante metálico (220 GPa). Nessa circunstância, este material atua como uma camada intercalar de transferência de cargas entre o implante metálico e o osso, entretanto, a menor resistência da interface cimento-osso muitas vezes está associada com a soltura da prótese^{70,91}.

Por sua vez, no uso deste material em falhas ósseas metafisárias, o cimento está em contato com osso trabecular. Apesar da penetração da massa de cimento nos interstícios das trabéculas promover uma interligação mecânica, o módulo de elasticidade deste material (2-3 GPa) é maior quando comparado ao osso esponjoso (50-800 MPa)⁹². O resultado disto é a redução da carga aplicada no tecido ósseo e a falta do estímulo necessário para remodelação, conduzindo a uma diminuição da densidade e enfraquecimento do osso. A redução da massa óssea culmina na soltura do cimento.

Ainda nesse sentido, durante o processo de polimerização do cimento ósseo um aumento no volume do material é observado, seguido de um encolhimento ao fim da reação, porém não para o volume inicial. A redução de volume é de aproximadamente 3,82 %-7,08 % e está associada com o aparecimento de pequenas rachaduras na interface osso-cimento^{70,93}.

O PMMA apresenta reação de polimerização exotérmica, onde a quebra da ligação C=C do monômero libera 57 kJ por mol de MMA⁷⁰. Estudos *in vitro* registraram que a temperatura de polimerização do PMMA convencional alcança valores de 70 a 120°C⁹⁴. O superaquecimento local *in vivo* pode conduzir a desnaturação do colágeno calcificado, como reportado na literatura em temperaturas próximas de 130°C⁹⁵, e consequentemente, reduzir a integridade biomecânica do osso⁹⁶. Além do mais, necrose térmica de tecidos adjacentes é evidenciada em temperaturas iniciais de 70°C^{97,98}. Apesar do superaquecimento ser um problema para tecidos normais, em casos de curetagem de tumores o aumento da temperatura local é útil e promove uma margem de segurança para o procedimento cirúrgico realizado.

Por fim e mais importante, os cimentos ósseos à base de PMMA possuem escassa habilidade osteoindutora e consequentemente, baixa osteointegração, o que conduz a formação de uma camada de tecido fibroso ao redor do implante e soltura asséptica⁸⁵. Neste contexto, o uso de cimentos de fosfato de cálcio surgiu como uma alternativa ao cimento ósseo de PMMA devido seu potencial osteocondutor, bioatividade e habilidade de formar uma pasta moldável que se autocura *in vivo*. Apesar disso, a demora no processo de endurecimento da pasta, sua degradação quando em contato com o fluido corporal, a baixa resistência e a natureza frágil deste material limitam seu uso em regiões de aplicação de carga^{99,100}. Por este motivo, o cimento ósseo de PMMA continua sendo o padrão nos processos clínicos descritos anteriormente.

Diversas tentativas vêm sendo realizadas visando melhorar os problemas citados anteriormente, destacando-se a criação de uma matriz porosa semelhante ao osso trabecular e a introdução de nanopartículas cerâmicas. Em ambiente cirúrgico, as metodologias passíveis de criação de uma matriz porosa são através da lixiviação de partículas ou formação de gás. A primeira envolve a adição de partículas solúveis em água⁹⁹ (como cloreto de sódio, glicose, manitol¹⁰¹, hialuronato de sódio⁹², glicerofosfato¹⁰², carboximetilcelulose¹⁰³, entre outros) durante a fabricação do cimento ósseo. A exposição deste material *in vivo* leva à dissolução das partículas e surgimento de poros. A porosidade e o tamanhos dos poros é controlado pela quantidade e pelo tamanho das partículas adicionadas¹⁰⁴. Por sua vez, o segundo método envolve a adição de substâncias que participam de reações ou se decompõem formando gases¹⁰⁵ (como por exemplo o bicarbonato de sódio^{91,106}). Diversas desvantagens estão relacionadas com a metodologia de lixiviação de partículas, principalmente no que diz respeito a falta de interconectividade da matriz, o aumento da viscosidade do material e a hiperosmose *in vivo* pela dissolução das partículas⁹⁹.

Pelos motivos citados anteriormente, o método de geração de gás vem ganhando destaque. A criação de um cimento esponjoso é capaz de controlar a diminuição no volume do cimento ósseo após a polimerização como resultado da expansão dos gases durante o processo de endurecimento do cimento. A expansão destes gases ocasiona uma tensão que impede o encolhimento do volume, resultando em uma redução da contração de volume de 7,6 % para 4 %⁹³. Ainda, a formação de uma estrutura porosa está vinculada com a diminuição da temperatura máxima de polimerização reduzindo as chances de necrose

térmica^{92,102}. Por fim, esta estratégia é capaz de diminuir a rigidez do material para valores mais próximos do osso trabecular, melhorando a fixação mecânica, e fornecer a microarquitetura necessária para chegada de suprimentos celulares, população do biomaterial, vascularização e crescimento ósseo, culminando em uma ligação química direta na interface osso-biomaterial.

A introdução de nanocerâmicas bioativas no cimento esponjoso pode ser utilizada como uma estratégia biomimética de melhorar as propriedades biológicas do material. Analisando-se as diferentes cerâmicas que vêm sendo incorporadas nas matrizes de cimentos ósseos à base de PMMA, algumas delas são recorrentes: biovidros^{107,108}, sílica mesoporosa¹⁰⁹, carbonato de estrôncio¹¹⁰ e fosfatos de cálcio^{94,111-113}, em especial hidroxiapatita (HA)^{102,114-119}. De fato, a hidroxiapatita tem sido extensivamente estudada como um aditivo bioativo na criação de materiais tipo-osso, visto sua semelhança com a apatita biológica¹²⁰. Em parte, essa semelhança é vista como o ponto chave da sua excelente biocompatibilidade, bioatividade, osteocondutividade, osteoindução e osteointegração *in vivo*¹²¹. Apesar da semelhança estrutural com a apatita biológica, a HA sintética ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) apresenta uma razão Ca/P igual a 1,67, enquanto a primeira possui uma razão que varia entre 1,37-1,87¹²², indicando que o mineral ósseo deve conter outros íons em sua estrutura, como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Cl^- , F^- , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , entre outros¹²³. Assim, em termos de mimetizar a apatita biológica, a HA sintética deve ser nanométrica e ter natureza carbonatada. Além do mais, é reconhecido que os elementos traços presentes no biomaterial ósseo também possuem papel chave no processo de remodelação óssea¹²⁴, e por este motivo, a incorporação destes na estrutura da HA sintética e outras cerâmicas vem despertando interesse.

Nesse contexto, os estudos recentes buscam incorporar cerâmicas bioativas dopadas nas matrizes de cimento ósseo de PMMA. Goñi et al¹²⁵ e Cui et al¹²⁶ produziram cimentos ósseos de PMMA contendo vidros bioativos substituídos por Sr^{2+} e alcançaram boas propriedades físicas e biológicas. No entanto, o primeiro grupo não reportou um estudo da liberação de íons Sr^{2+} da matriz e o segundo não obteve liberação controlada destes íons. Ainda, Liu et al¹²⁷ e Matos et al¹²⁸ incorporaram fosfatos de cálcio modificados por Sr^{2+} e Mg^{2+} nesta mesma matriz e também tiveram resultados promissores em relação ao PMMA convencional. Estes autores atingiram liberação controlada dos íons em questão. Apesar das vantagens reportadas, todos os estudos anteriores foram realizados em cimentos de

PMMA sólidos, e por este motivo, apenas uma pequena dosagem de íons foi liberada. Assim, os resultados que serão apresentados nesta dissertação superaram as barreiras descritas anteriormente por meio da criação de uma matriz de cimento ósseo poroso de PMMA carregado com HA substituída por Sr^{2+} em diferentes porcentagens molares. Através da associação de uma matriz porosa e a localização preferencial das partículas na superfície destes poros puderam ser obtidos perfis de liberação controlada de Sr^{2+} em dosagens para fins terapêuticos. O papel dos íons Sr^{2+} no metabolismo ósseo será descrito a seguir.

1.4. O papel do Sr^{2+} no metabolismo ósseo

Grande parte dos procedimentos clínicos realizados em ortopedia são resultados de patologias no sistema ósseo. Dentre estas patologias, a osteoporose acomete grande parte da população mundial e está associada com um balanço negativo no processo de remodelação, resultando em massa óssea diminuída e grande riscos de fraturas¹²⁹. As terapias para esta patologia incluem a inibição da reabsorção com o uso de bifosfonatos e hormônios iguais ou similares aos endógenos ou o aumento da formação óssea através de agente análogo ao hormônio da paratireóide. Contudo, o alto custo dos tratamentos acima citados e os efeitos adversos associados com o uso destes medicamentos inviabilizam sua utilização. Quando em pequenas doses, o ranelato de estrôncio surge como uma alternativa no tratamento da osteoporose, atuando de modo contrário nos processos de formação e reabsorção óssea¹³⁰. *In vivo*, a utilização deste fármaco está associada com o aumento na massa e na densidade mineral óssea. Seus efeitos positivos estão relacionados com a presença de Sr^{2+} , o qual é um elemento traço no mineral ósseo¹²⁹ e possui efeito direto na fisiologia celular normal¹³¹.

De fato, estudos *in vitro* evidenciaram que o uso de ranelato de estrôncio em tratamento contínuo ocasiona aumento da expressão dos marcadores de formação óssea (ALP, BSP, OCN), no número de nódulos de mineralização e na síntese de colágeno por osteoblastos. Ainda, este fármaco proporciona a diferenciação de precursores osteoblásticos em osteoblastos maduros. Em contraste, o ranelato de estrôncio conduz a diminuição na formação e maturação dos osteoclastos, e está associado com a ruptura da zona clara destas células, a qual é a região responsável pela vedação e reabsorção óssea¹³⁰.

Esta evidência explica o comportamento dose-dependente do processo de reabsorção óssea na presença de Sr^{2+} . Os mecanismos de ação do Sr^{2+} nas células ósseas ainda não estão completamente elucidados, e continuam sobre intensa investigação. Apesar disso, devido a semelhança entre os íons Ca^{2+} e Sr^{2+} acredita-se que eles atuam por mecanismos similares. O receptor sensível a cálcio (CaSR) está presente nos osteoclastos e osteoblastos e foi proposto como um dos protagonistas deste processo devido a capacidade de reconhecer cátions divalentes e sentir a variação na concentração destes. O aumento da concentração extracelular de Ca^{2+} está associado com a ativação deste receptor em osteoclastos e a estimulação de uma via de sinalização dependente de fosfolipase C que induz a apoptose dessas células¹³². Assim como mostrado para o Ca^{2+} , altas concentrações de Sr^{2+} também ativam este receptor e resultam na apoptose dos osteoclastos, entretanto, este processo é mediado por uma via de sinalização diferente¹³³. Em culturas osteoblásticas pré-tratadas com inibidores do receptor CaSR, uma antagonização do efeito do Sr^{2+} na diferenciação celular e mineralização é observada, apontando que a eficiência deste íon deve estar parcialmente relacionada com este receptor¹³⁴. Entretanto, osteoblastos provenientes de ratos com o gene de CaSR desativado tiveram o efeito proliferativo mantido na presença de altas concentrações de Sr^{2+} ¹³⁵. Assim, apesar deste mecanismo estar associado com os efeitos terapêuticos observados em altas concentrações de Sr^{2+} , este não deve ser considerado o único possível e outros caminhos como o sistema RANK/RANKL/OPG também devem estar envolvidos^{131,136}.

Apesar das vantagens citadas anteriormente, o uso de ranelato de estrôncio por administração oral está associado com uma biodisponibilidade de íons Sr^{2+} de apenas 20 %¹³⁷, sendo necessário altas doses sistêmicas para alcançar os efeitos positivos deste íon, o que pode gerar efeitos colaterais relacionados ao ácido ranélico. É nesse contexto que a liberação deste íon *in situ* vêm ganhando destaque. Assim, a criação de cimentos ósseos porosos de PMMA contendo partículas de HA substituídas por Sr^{2+} pode fornecer liberação local deste íon e promover melhor osteointegração do implante com o aumento da formação óssea, além de ser promissor em casos de substituições ósseas em pacientes osteoporóticos.

Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Sintetizar partículas de HA substituídas por diferentes porcentagens molares de Sr^{2+} e sua posterior incorporação em cimentos ósseos porosos à base de PMMA.

De forma a se atingir o objetivo geral foram propostos os seguintes objetivos específicos.

2.2. Objetivos específicos

1. Obter partículas de HA substituídas por Sr^{2+} (Ca-Sr-HA) e avaliar os efeitos da incorporação deste íon na estrutura, morfologia, tamanho e propriedades superficiais da HA.
2. Preparar matrizes poliméricas porosas à base de PMMA carregadas com partículas Ca-Sr-HA tratadas termicamente contendo Sr^{2+} em diferentes porcentagens molares (10-100% Sr^{2+}).
3. Avaliar o efeito da incorporação das partículas na temperatura máxima de polimerização e tempo de secagem do cimento.
4. Verificar a localização preferencial de Ca-Sr-HA na matriz polimérica por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva por raios-X e microtomografia computadorizada.
5. Determinar propriedades morfométricas e mecânicas das amostras.
6. Estudar e quantificar a liberação local de íons Sr^{2+} e Ca^{2+} em tampão PBS e meio de cultura a 37°C .
7. Testar a bioatividade dos cimentos *in vitro* por meio de exposição à solução que simula o pH e composição iônica do fluido corpóreo (SBF).
8. Avaliar a toxicidade das diferentes amostras em culturas de osteoblastos *in vitro*.

Metodologia

3.1. Síntese de nanopartículas de hidroxiapatita substituídas por Sr^{2+} (Ca-Sr-HA)

Nanopartículas de HA substituídas por Sr^{2+} (nomeadas ‘Ca-Sr-HA’ neste trabalho) foram sintetizadas por metodologia baseada em precipitação química por via úmida desenvolvida por nosso grupo. Com este fim, foram preparadas soluções aquosas contendo $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Synth) e SrCl_2 (Synth) com concentração total $[\text{Ca}^{2+}] + [\text{Sr}^{2+}] = 0,10 \text{ mol.L}^{-1}$. Misturas de soluções contendo diferentes porcentagens molares de Sr^{2+} em relação ao número total de mols dos cátions ($\text{Ca}^{2+} + \text{Sr}^{2+}$) foram preparadas, as quais foram nomeadas de 0% Sr^{2+} , 10% Sr^{2+} , 30% Sr^{2+} , 50% Sr^{2+} , 70% Sr^{2+} , 90% Sr^{2+} e 100% Sr^{2+} . Essas soluções foram vigorosamente misturadas com uma solução aquosa de H_3PO_4 (Sigma) $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$, de forma a se obter uma razão Ca/P igual a 1,67, que é encontrada na HA. O pH, por sua vez, foi ajustado para obtenção de meio básico (pH~11) por meio da adição de NH_4OH (Synth) $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ sob vigorosa agitação utilizando-se um ultra turrax (22.000 rpm, 5 min), favorecendo a precipitação de Ca-Sr-HA. Após esta etapa, a reação foi mantida por um período de 1 hora sob agitação. O precipitado foi filtrado e lavado repetidamente com água e etanol para remoção de sais solúveis e essas amostras foram submetidas a tratamento térmico por um período de 8 horas a 600°C .

Figura 6. Representação da metodologia de precipitação das partículas Ca-Sr-HA.

3.2. Caracterização química das partículas Ca-Sr-HA

As partículas foram caracterizadas quanto à sua estrutura através da técnica de difração de raios-X por meio de um equipamento Bruker-AXS D2 Phaser (DQ-FFCLRP)

com radiação Cu K α $\lambda=1,54060$ Å (10 mA, 30 kV), sendo a faixa de varredura de 2 θ de 10° a 60°. Para atribuição dos picos foram utilizados os bancos de dados Crystallography Open Database (COD) e American Mineralogist Crystal Structure Database (AMCSD). O tamanho do cristalito foi calculado utilizando-se a equação de Scherrer na direção do plano (002) (pico 24-27°). As possíveis mudanças na estrutura do cristal foram quantificadas. Com este fim, as distâncias interplanares (d) foram calculadas (pico 24-27° (002); pico 38-40° (310)) permitindo a obtenção dos parâmetros de rede a e c (Å) para o cristal (equações 1 e 2).

$$\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + l^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (2)$$

Os grupos químicos foram identificados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) na faixa de 4000-400 cm⁻¹ utilizando um espectrofotômetro IR Prestige-21 Shimadzu (Laboratório de Atividade Biológica e Química Supramolecular de Compostos de Coordenação-DQ-FFCLRP). Com este fim, foram preparadas pastilhas com aproximadamente 1 mg das amostras misturadas com KBr e prensadas a 10 ton por 4 minutos.

A morfologia das partículas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio Superscan SS-550 Shimadzu (DQ-FFCLRP), com uma aceleração de voltagem de 20 kV. As amostras foram recobertas com ouro por pulverização catódica (Bal-Tec, SCD-050 Sputter Coater) antes da aquisição das imagens. Análise elementar de cálcio, estrôncio e fósforo e a porcentagem molar de Sr²⁺ das partículas foi quantificada através da espectroscopia de energia dispersiva por raios-X (EDS) utilizando IXRF Systems modelo 500 Digital Processing (DQ-FFCLRP).

O tamanho das partículas foi medido por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz utilizando um ZetaSizer Malvern Nano ZS Malvern Instruments (Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides-DQ-FFCLRP) (ângulo de medida 173°, laser 633 nm).

Propriedades superfícies foram avaliadas através de medidas de ângulo de contato (θ) e potencial-zeta (ζ). A primeira técnica se baseia no uso de um goniômetro (OCA-20 Dataphysics) acoplado a uma câmera responsável por coletar imagens de uma gota depositada sobre a superfície sólida em questão, e um software SCA-20, o qual extrai a

tangente do ângulo formado entre a superfície e a gota (DQ-FFCLRP). Através da aproximação de Owens-Wendt-Kaelble (equação 3) e da medida do θ médio entre diferentes líquidos e a superfície do sólido pode-se obter as componentes polares e dispersivas da energia livre de superfície (γ_S) do sólido.

$$\gamma_L (1 + \cos\theta) = 2(\gamma_L^d \gamma_S^d)^{1/2} + 2(\gamma_L^p \gamma_S^p)^{1/2} \quad (3)$$

onde os subscritos S e L correspondem as superfícies sólidas e líquidas e os sobrescritos p e d correspondem a polar e dispersiva.

Com este fim, foram utilizados três solventes de polaridades diferentes, os quais possuíam tensão superficial, componentes dispersivas (γ_L^d) e polares (γ_L^p) conhecidas, sendo eles: água deionizada, diiodometano (Sigma-Aldrich, PA) e formamida (J. T. Baker, PA). As partículas de Ca-Sr-HA foram prensadas em pastilhas para obtenção de uma superfície homogênea e sem rugosidade e a partir das medidas de ângulo de contato desses solventes com a superfície estudada pôde-se determinar algebricamente as γ_S^p , γ_S^d e a γ_S , a qual é dada pela somatória das suas componentes.

Por sua vez, a medida de potencial- ζ visou avaliar a carga existente na interface partícula-líquido e a estabilidade desta. Dispersões coloidais que possuem potencial superior a ± 25 mV são consideradas estáveis¹³⁸. Utilizou-se uma solução 10 mM de NaCl em água ultrapura para suspensão das partículas como solução de eletrólito suporte para manter a condutividade constante em todas as medidas^{138,139}. A determinação do potencial pelo instrumento é realizada através da mobilidade eletroforética (U) das partículas de acordo com a equação de Smoluchowski¹³⁸:

$$\zeta = \frac{U\eta}{\varepsilon} \quad (4)$$

onde ζ é o potencial zeta, U é a mobilidade eletroforética, η é a viscosidade do meio e ε é a constante dielétrica.

3.3. Preparo de cimento ósseo poroso à base de PMMA contendo partículas Ca-Sr-HA

O preparo do cimento ósseo à base de PMMA seguiu as instruções do fabricante (cimento cirúrgico Johnson & Johnson®, marca De Puy®, SmartSet™ MV Endurance, England) com algumas alterações envolvendo a formação de uma matriz porosa e a

introdução de partículas bioativas. Com este fim, a metodologia de geração de gás através do uso de bicarbonato de sódio e ácido cítrico descrita por Cimatti⁹¹ foi utilizada para formação de poros, e as partículas Ca-Sr-HA tratadas termicamente que continham Sr²⁺ em sua estrutura (10-100% Sr²⁺) foram introduzidas no preparo do cimento ósseo.

O kit SmartSet MV Endurance apresenta um componente sólido constituído de esferas de PMMA (67.05% w/w), copolímero de estireno/metacrilato de metila (21.10% w/w), peróxido de benzoíla (1.85% w/w) e sulfato de bário (10% w/w), e um componente líquido, contendo metacrilato de metila (98 wt%), N,N-Dimetil-p-toluidina (1.50 wt%) e hidroquinona (ppm). O sulfato de bário atua como agente radiopaco e a hidroquinona como estabilizante do monômero, impedindo que o MMA polimerize no frasco.

Brevemente, foram misturados 40,0 g do componente sólido à 10,5 g de bicarbonato de sódio (Synth) em presença de 8,0 g de ácido cítrico (Synth). A esta mistura adicionou-se 1 wt% de partícula Ca-Sr-HA, com relação aos 40 g do componente sólido, e realizou-se a homogeneização. Todas partículas Ca-Sr-HA tratadas termicamente foram adicionadas nos cimentos ósseos, com excessão da partícula nomeada 0% Sr²⁺. Os cimentos ósseos foram nomeados de acordo com a porcentagem molar de Sr²⁺ presente na partícula inserida em sua matriz em: controle (ausência de partícula Ca-Sr-HA), 10% Sr²⁺, 30% Sr²⁺, 50% Sr²⁺, 70% Sr²⁺, 90% Sr²⁺ e 100% Sr²⁺.

Após esta etapa, adicionou-se 18,8 g do agente polimerizante (componente líquido) fornecido pelo fabricante iniciando a contagem de tempo (tempo 0). Os componentes misturados foram homogeneizados até o terceiro minuto formando uma massa, onde foi adicionado 5,0 mL de água deionizada, dando início à reação que produz o gás, como mostrado abaixo (reação R1).

No quarto minuto transferiu-se a mistura para moldes cilíndricos de teflon (6 cm de altura e 3 cm de diâmetro) e no quinto minuto tampou-se os moldes impedindo a expansão do cimento devido a formação de gás. Os corpos de provas obtidos (20 mm de diâmetro e 30 mm de altura) foram retirados dos moldes após 48 horas e as caracterizações realizadas estão descritas nas próximas seções. A metodologia de fabricação dos cimentos ósseos porosos contendo Ca-Sr-HA está resumida na Figura 7.

Figura 7. Preparo de cimento ósseo poroso à base de PMMA. Os componentes sólidos foram inicialmente homogeneizados e em seguida foi adicionado o agente polimerizante formando uma massa (tempo 0). No terceiro minuto água foi adicionada à mistura e no quarto minuto realizou-se a transferência desta para o molde de teflon. Passados cinco minutos o molde foi fechado, permitindo o enrijecimento da mistura com o tempo. As amostras foram retiradas dos moldes após 48 horas.

3.3.1. Avaliação do tempo de secagem e da temperatura máxima de polimerização das amostras ($T_{\text{máx}}$)

A análise do tempo de secagem do cimento ósseo envolve o tempo de pega e o tempo de cura, onde o primeiro é definido como o tempo após misturar os componentes sólidos e líquidos no qual a mistura se torna uma massa que atinge viscosidade suficiente para ser manuseada, enquanto o segundo é definido como o tempo no qual o material enrijece. Sendo assim, o período ideal para manuseio e implantação do cimento encontra-se entre esses dois tempos.

Com este fim, visando a realização da medida do tempo de pega os componentes do cimento foram misturados (tempo 0) e esta mistura foi tocada a cada 15 segundos por luvas até o momento que a massa obtida deixasse de grudar. O tempo no qual não havia mais adesão da mistura à superfície plástica das luvas foi definido como o tempo de pega.

Por sua vez, a mudança de temperatura durante a reação de polimerização foi acompanhada com o uso de um termopar dentro do molde de teflon fechado. Brevemente, no decorrer do preparo do cimento ósseo como descrito na seção 3.3, a massa foi introduzida no molde de teflon (tempo 4) com o termopar afixado no centro da amostra e a temperatura acompanhada para a obtenção da $T_{\text{máx}}$.

O tempo de cura é considerado o tempo no qual a temperatura do cimento (T_{cura}) é exatamente a metade entre a temperatura ambiente (T_{amb}) e a temperatura máxima

($T_{\text{máx}}$)^{92,94} como descrito na equação 5. Todas as medidas foram realizadas pelo menos em triplicata ($n=3$) e em temperatura de $\sim 23^{\circ}\text{C}$.

$$T_{\text{cura}} = \frac{T_{\text{amb}} + T_{\text{máx}}}{2} \quad (5)$$

3.3.2. Avaliação morfológica dos corpos de prova por MEV

A morfologia da superfície, distribuição das partículas Ca-Sr-HA e a porosidade das amostras foram avaliadas por MEV em um microscópio Superscan SS-550 Shimadzu (DQ-FFCLRP) operado com uma aceleração de voltagem de 15 kV em diferentes magnificações. As amostras foram recobertas com carbono e/ou ouro por pulverização catódica (Bal-Tec, SCD-050 Sputter Coater) antes da aquisição das imagens.

3.3.3. Caracterização estrutural dos cimentos ósseos após a incorporação de Ca-Sr-HA pela técnica de DRX

A presença da fase mineral na matriz polimérica foi analisada através da técnica de difração de raios-X utilizando um difratômetro Bruker-AXS D2 Phaser (DQ-FFCLRP) com radiação Cu K α $\lambda=1,54060 \text{ \AA}$ (10 mA, 30 kV). A faixa de varredura de 2θ analisada foi de 5 a 70° . Para atribuição dos picos foram utilizados os bancos de dados Crystallography Open Database (COD) e American Mineralogist Crystal Structure Database (AMCSD).

3.3.4. Análise elementar e mapeamento

Análise e mapeamento elementar utilizando-se EDS (IXRF Systems modelo 500 Digital Processing-DQ-FFCLRP) foram realizados para avaliar a presença e quantificar elementos de interesse, assim como verificar a distribuição destes na superfície dos cimentos.

3.3.5. Medida de variação de pH

A variação de pH ocasionada pela imersão das amostras de cimento ósseo em meio líquido foi acompanhada. Com este fim, amostras do cimento foram usinadas (Oficina de Precisão do Campus USP-RP) utilizando torno de alta precisão em peças cilíndricas de 5 mm de altura e 12 mm de diâmetro (Figura 8) as quais em seguida foram imersas em meio

de cultura celular (α -MEM) a 37°C, e o pH foi acompanhado durante um período de 72 horas com auxílio de um pHmetro (Denver Instrument ub-10).

Figura 8. Imagem da peça cilíndrica obtida após usinagem em moeda (5 mm de altura e 12 mm de diâmetro).

3.3.6. Avaliação morfométrica (3D) por Microtomografia Computadorizada (micro-CT)

A técnica de micro-CT foi utilizada para examinar as propriedades morfométricas e a distribuição das partículas Ca-Sr-HA nas amostras. Brevemente, imagens das amostras foram adquiridas com um microtomógrafo de alta resolução modelo 1172 phoenix V/Tome/x da marca General Eletrics (Centro para Documentação da Biodiversidade-DB/FFCLRP) com condições de aquisição de 70 kV e 200 μ A. A reconstrução das imagens foi realizada utilizando um software específico (Phoenix Datos|x). As imagens reconstruídas foram processadas com o software CTan (v. 1.16, SkyScan/Bruker, Bélgica) para determinação dos parâmetros: fração do volume de cimento ósseo (CV/TV, %), superfície de cimento específica (CS/BV, %), porosidade total (% de CV/TV), tamanho médio dos poros ($Tb.Sp^*$, μ m) e porcentagem de distribuição (ou frequência) dos poros na matriz. A análise da porosidade total incluiu poros abertos (%) e poros fechados (%).

O software CTvox (v. 3.2, SkyScan/Bruker, Bélgica) foi utilizado para obtenção de imagens 3D das amostras com cortes em sua estrutura, permitindo a visualização da superfície externa e da região interna dos corpos de prova. Por sua vez, com o uso do software DataViewer (v.1.5..2, SkyScan/Bruker, Bélgica) obteve-se imagens 2D de cortes transversais das amostras.

3.3.7. Ensaio de compressão

As propriedades mecânicas de pelo menos 2 amostras de cada grupo ($n=2$) foram avaliadas por ensaios de compressão utilizando velocidade de 20 mm/min e deslocamento

final de 10 mm em uma máquina de ensaios mecânicos Instron® modelo 8872 (Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP) e um software Complete Bluehill 2 Software Suite o qual é responsável por plotar gráficos de força x deslocamento e tensão x deformação. A partir dos gráficos os valores de Módulo de Young (E_c) e Tensão máxima compressiva (σ_c) foram obtidos.

3.3.8. Estudo *in vitro* de liberação de Sr^{2+} e Ca^{2+}

A quantidade de íons Sr (mg/L) liberado das amostras imersas em tampão PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4) e de íons Sr e Ca liberados em meio de cultura celular (α -MEM) foi determinada com o uso de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 700 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha), utilizando um atomizador de chama ar-acetileno. O comprimento de onda empregado para as análises de Sr^{2+} e Ca^{2+} foram de 460 e 422 nm, respectivamente. As alíquotas de liberação foram previamente preparadas através da adição de 1% (m/v) $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) , 0,1% (m/v) KCl (J.T.Baker) e 1% (v/v) HCl (Synth).

Brevemente, para determinação da liberação cumulativa de Sr^{2+} em PBS os cimentos ósseos foram preparados como descrito previamente na seção 3.3. e usinados (Oficina de Precisão do Campus USP-RP) utilizando torno de alta precisão em peças cilíndricas de 5 mm de altura e 20 mm de diâmetro. Realizou-se a imersão destas em 4 mL da solução a 37°C e os frascos foram hermeticamente vedados para que não ocorresse evaporação do líquido. Em diferentes tempos (0, 12, 72, 120, 168, 336 horas) as alíquotas foram totalmente retiradas para medição de íons Sr^{2+} e substituídas pela mesma quantidade.

Por sua vez, para quantificação dos íons Sr e Ca em meio de cultura (α -MEM), os cimentos ósseos foram usinados em peças cilíndricas de 5 mm de altura e 12 mm de diâmetro (Figura 8) a fim de se ajustarem ao tamanho dos poços de uma placa para cultivo de células de 24 poços. As amostras usinadas foram imersas em 1 mL do meio em questão e alíquotas em diferentes tempos foram retiradas para análise de Sr^{2+} (0, 2, 6, 12, 24, 72, 120, 216, 336 horas) e Ca^{2+} (0, 2, 6, 12, 24 e 72 horas).

A % de Sr^{2+} liberada em PBS e meio de cultura para os diferentes tempos foi calculada considerando a quantidade em miligramas de Sr^{2+} que deveria estar presente nas

peças usinadas (com as dimensões especificadas anteriormente), uma vez que inicialmente os cimentos antes da usinagem (20 mm de diâmetro e 30 mm de altura) possuíam uma quantidade de 1 wt% de Ca-Sr-HA, com diferentes porcentagens molares.

3.3.9. Avaliação *in vitro* da bioatividade dos cimentos ósseos

Para avaliação da bioatividade dos corpos de prova foi preparada uma solução que simula o pH e composição iônica do fluido corporal (SBF) como descrita por Kokubo et al¹⁴⁰. O teste *in vitro* foi realizado por meio da imersão das peças de cimento ósseo (5 mm de altura e 12 mm de diâmetro) em 25 mL de SBF a 37°C, o qual foi substituído semanalmente.

FTIR foi empregado para caracterização das ligações químicas antes e após a exposição ao SBF. Utilizou-se o acessório de reflexão total atenuada na superfície (ATR) em um espectrofotômetro IR Prestige-21 Shimadzu (Laboratório de Terras-Raras-DQ-FFCLRP). A análise foi realizada na faixa de 2000-600 cm⁻¹.

A aposição de apatita na superfície dos cimentos também foi analisada através da técnica de espectroscopia de energia dispersiva por raios-X (EDS) utilizando IXRF Systems modelo 500 Digital Processing (DQ-FFCLRP), sendo possível avaliar a presença e quantificar os elementos de interesse (Ca e P) na superfície da amostra.

A morfologia da apatita depositada foi obtida por microscopia eletrônica de varredura em um microscópio Superscan SS-550 Shimadzu (DQ-FFCLRP) operado com uma aceleração de voltagem de 20 kV em diferentes magnificações. As amostras foram recobertas com carbono e ouro por pulverização catódica (Bal-Tec, SCD-050 Sputter Coater) antes da aquisição das imagens.

3.3.10. Testes de viabilidade celular

Células pré-osteoblásticas de linhagem murina MC3T3-E1 (American Type Culture Collection-ATCC) foram cultivadas em alpha minimum essential medium (α -MEM, Gibco) suplementadas com 10% de soro bovino fetal, 1% (v/v) de estreptomicina/penicilina e foram incubadas em atmosfera humidificada a 37°C e 5% CO₂. Após atingida a confluência, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em α -MEM e plaqueadas na presença das amostras de cimento (5 mm de altura e 12 mm de diâmetro) em uma placa de 24 poços

com uma densidade de 2×10^4 células por poço. Anteriormente ao teste de viabilidade, as peças cilíndricas de cimento foram esterilizadas utilizando irradiação ultravioleta durante o período de uma hora em cada um dos lados.

A viabilidade celular das células MC3T3-E1 cultivadas na presença das amostras (controle, 10% Sr^{2+} , 30% Sr^{2+} , 50% Sr^{2+} , 70% Sr^{2+} , 90% Sr^{2+} e 100% Sr^{2+}) foi avaliada através do teste clássico de MTT descrito por Mosmann¹⁴¹ e adaptado por Faria et al¹⁴² nos períodos de 72 horas e 7 dias. Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazóli (MTT) é um sal amarelo que produz um composto de coloração azul escura, o formazan, devido à redução de NADH presente nas células. Após a reação do teste colorimétrico, a absorbância de cada poço foi medida em 560 e 690 nm utilizando um espectrofotômetro de Elisa UV-Vis (Molecular Devices). A viabilidade celular foi expressa como porcentagem da média de três experimentos em relação ao cimento controle (sem partícula Ca-Sr-HA em sua estrutura) em cada um dos dias de cultura (100%).

3.3.11. Análise estatística

Os dados foram estatisticamente analisados utilizando análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativamente diferentes em $p < 0.05$.

Resultados e Discussão

4.1. Caracterização química das partículas Ca-Sr-HA

A apatita biológica encontrada no corpo humano apresenta substituição por diversos íons, sendo um deles o Sr^{2+} , devido à similaridade da razão carga/raio com o Ca^{2+} ¹⁴³. Em virtude das vantagens ocasionadas pelo Sr^{2+} no aumento da formação e prevenção da reabsorção óssea¹³⁰, muitos estudos estão analisando os impactos estruturais e biológicos da presença deste íon em apatitas sintéticas^{124,143,144}. Neste estudo, inicialmente foi realizado o preparo de nanopartículas de Ca-Sr-HA e os efeitos estruturais ocasionados pela presença deste íon foram analisados.

Figura 9. Padrão de DRX da série de partículas Ca-Sr-HA (0-100% Sr^{2+}) sem tratamento térmico. Os picos de difração da amostra 0% Sr^{2+} estão relacionados com o padrão (●) AMCSD 0002281 para HA pura. Ao aumentar a quantidade de Sr^{2+} pode-se observar a formação de partículas amorfas (10-50% Sr^{2+}). A partir de 70% Sr^{2+} nota-se o aparecimento de picos de difração, sendo estes relacionados à estroncianita (■) AMCSD 0000234 para 70% Sr^{2+} e uma mistura dessa fase com estrôncio apatita (▲) COD 9011132 para as amostras 90 e 100% Sr^{2+} .

Os padrões de DRX antes do tratamento térmico apresentaram picos bem definidos para a amostra 0% Sr^{2+} (Figura 9, linha vinho), os quais estavam relacionados com a estrutura de HA hexagonal pura (grupo espacial $P6_3/m$) (AMCSD 0002281). Efeito desestabilizador e perda da simetria são observados em baixas porcentagens molares de Sr^{2+} (10-50% Sr^{2+}) por meio do alargamento do padrão de DRX na região de 20 a 40° relacionado a partículas amorfas (Figura 9, linhas rosa, bege e verde, respectivamente). Este efeito é consequência da dificuldade de acomodar um cátion maior (Sr^{2+}) em uma estrutura

cristalina que apresenta majoritariamente um íon de tamanho menor (Ca^{2+})¹⁴³. O aumento das porcentagens molares de Sr^{2+} , leva a picos mais definidos no DRX relacionados a maior ordenamento estrutural, sendo estes correspondentes à estroncianita (grupo espacial $Pm\bar{n}$) (AMCSD 0000234) em 70% Sr^{2+} (Figura 9, linhas azul), e uma mistura desta fase com estrôncio apatita (grupo espacial $P6_3/m$) (COD 9011132) a partir de 90% Sr^{2+} (Figura 9, linhas uva e roxo).

Mediante processo de troca iônica, a imersão de osso em pó em solução de SrCl_2 revelou uma dopagem máxima de 10%, independente do tempo¹⁴⁵. Por sua vez, a presença de 15% deste íon em uma síntese rápida de HA (horas) é suficiente para o surgimento de fase amorfa, evidenciada por SAED¹⁴⁶. Entretanto, em sistemas de precipitação biomimética lenta (dias), partículas de HA com maior organização estrutural são produzidas, as quais suportam a conservação da simetria em quantidade maior de Sr^{2+} (25% Sr^{2+})¹²⁴. Desta forma, divergência em relação à quantidade total de Sr^{2+} que pode ser incorporada no mineral ósseo com manutenção da simetria da HA pode ser destacada. Estes resultados sustentam o fato de que a inserção máxima deste íon com manutenção da simetria é dependente da metodologia *in vitro* de precipitação. Em estudo *in vivo* realizado em macacos, o mineral ósseo mostrou uma incorporação de 12,3%, a qual não estava relacionada com a dose de ranelato de estrôncio administrada¹⁴⁷.

Independentemente das diferentes incorporações máximas descritas nos estudos anteriores, a manutenção da simetria da HA é sempre acompanhada pelo alargamento dos picos de difração¹⁴⁶. Isto está de acordo com o decréscimo na cristalinidade das partículas ocasionado pela distorção no ambiente do grupo fosfato e diminuição na simetria^{124,146}. Ainda, em determinadas quantidades a presença deste íon favorece a precipitação de fosfatos de cálcio amorfos (ACP), como mostrado neste e em outros estudos^{124,146,148}. Em porcentagens molares altas, a presença de Sr^{2+} é majoritária, sendo evidenciada a precipitação de nova fase cristalina, como descrito por nosso estudo e de Lagergren et al¹⁴⁸ através da formação de estrôncio apatita, e por sua vez, o estudo de Tovani et al¹²⁴ que reportou a precipitação de uma fase mineral chamada sal de Collins em 100% Sr^{2+} . A fase cristalina precipitada na presença de grande quantidade de íons Sr^{2+} é dependente do pH da reação, dessa forma, reações em pH elevados (~ 10.5) favorecem a precipitação da primeira fase descrita, enquanto em pH ~ 7.5 é reportada a precipitação preferencial de sal de Collins¹⁴⁹.

A mesma tendência descrita anteriormente é vista para os íons Mg^{2+} . Embora 0,6% deste íon seja encontrado no esmalte da dentina, limitação na sua incorporação e um efeito desestabilizador foi demonstrado em apatitas sintéticas¹⁵⁰. Semelhantemente ao Sr^{2+} , pequenas quantidades de Mg^{2+} favorece a precipitação de fosfato de cálcio amorfo e em maiores a formação de novas fases cristalinas são observadas¹⁵⁰. Estes achados suportam o grande papel do raio iônico dos cátions na estrutura da HA.

Ainda sobre o DRX, como mostrado na Figura 9, duas fases distintas foram formadas em altas porcentagens molares de Sr^{2+} (70-100% Sr^{2+}), sendo elas a estroncianita e a estrôncio apatita. Inesperadamente, a primeira ($SrCO_3$) surge como consequência da absorção de dióxido de carbono (CO_2) presente na atmosfera pela solução alcalina durante o preparo das partículas, como mostrado na reação abaixo (R2)¹⁵¹. A 25°C e 1 bar, a concentração de CO_2 que pode ser dissolvida é de aproximadamente 33,9 mmol/L¹⁵².

Diversas reações sucedem a sua dissolução¹⁵², as quais são responsáveis por formar diferentes espécies: $H_2CO_{3(aq)}$, $HCO_{3(aq)}^-$, $CO_{3(aq)}^{2-}$, como mostrado a seguir.

Os íons de carbonato (CO_3^{2-}) interagem com o Sr^{2+} presente em solução, conduzindo a precipitação de $SrCO_3$. Como indicado por Yantão et al¹⁴⁵, o aparecimento desta fase cristalina após a dopagem de HA com Sr^{2+} é consequência de seu produto de solubilidade (Kps), o qual é menor quando comparado ao do $CaCO_3$ (7×10^{-10} e $4,7 \times 10^{-9}$, respectivamente). Isto sugere que na presença de grande quantidade de Sr^{2+} ocorre o favorecimento da precipitação de carbonato de estrôncio devido ao menor Kps¹⁴⁵.

A fim de obter uma melhor visão do papel do Sr^{2+} na estrutura da HA, espectros de infravermelho foram registrados para a série de partículas antes do tratamento térmico (0-100% Sr^{2+}) (Figura 10).

Figura 10. Espectro FTIR das partículas (0-100% Sr^{2+}) antes do tratamento térmico evidenciando bandas de absorção típicas relacionadas aos grupos PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , OH^- e moléculas de H_2O . A diminuição na definição das bandas do grupo PO_4^{3-} a partir de 10% Sr^{2+} e posterior reaparecimento em 90% Sr^{2+} é notória, o que corrobora com os resultados obtidos por DRX. (○) indica o modo ν_2 do grupo fosfato para 0% Sr^{2+} .

Diminuição na resolução das bandas de absorção do grupo PO_4^{3-} com o aumento da quantidade de íons Sr^{2+} pode ser observada, o que corrobora com o decréscimo na cristalinidade das partículas evidenciado por DRX^{2,124}. Em 0% Sr^{2+} são apresentadas bandas bem resolvidas relacionadas aos modos de vibração do grupo fosfato, as quais estão de acordo com a precipitação de uma fase cristalina de HA, sendo estas: (i) modo ν_2 em $\sim 472 \text{ cm}^{-1}$, (ii) modo ν_4 em $\sim 565 \text{ cm}^{-1}$, (iii) modo ν_4 em $\sim 606 \text{ cm}^{-1}$, (iv) modo ν_1 em $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ e (v) modo ν_3 em ~ 1036 e 1100 cm^{-1} . A perda da degenerescência dos modos ν_4 e ν_3 , o enfraquecimento do modo ν_1 e a ausência do modo ν_2 suportam a informação de que a incorporação de Sr^{2+} é responsável por diminuir a simetria das amostras e formar fases amorfas^{153,154}, como evidenciado para as porcentagens molares a partir de 10% Sr^{2+} . Estas bandas voltam a ter definição a partir de 90% Sr^{2+} , o que valida a ausência de estrôncio apatita em 70% Sr^{2+} , assim como indicado por DRX.

Processos de precipitação rápidos são responsáveis por incluir água mais facilmente entre os agregados de partículas¹⁵⁵, como notado pela presença de uma banda mais estreita em $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ e uma larga de $2600\text{-}3700 \text{ cm}^{-1}$, as quais correspondem a água adsorvida e aprisionada na estrutura^{154,155}. Notavelmente, esta última banda é relativamente mais alargada na série de 10 a 70% Sr^{2+} , consoante com o alto grau de hidratação de fases amorfas^{2,124}.

O aparecimento de bandas na região de $1350\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ e em $\sim 872\text{ cm}^{-1}$ é atribuído a presença de CO_3^{2-} . Contudo, esta última banda também pode indicar HPO_4^{2-} incorporado na estrutura das partículas, tornando difícil a identificação exata de qual grupo é responsável pelo seu aparecimento, uma vez que o infravermelho de apatitas carbonatadas não é trivial, e a sobreposição de bandas das diferentes espécies pode levar a resultado ambíguo². Ainda, pode ser notado um aumento na intensidade das bandas relacionadas ao modo vibracional ν_3 do carbonato nas amostras a partir de 70% Sr^{2+} , o que está de acordo com a precipitação de estroncianita.

O efeito de tratamento térmico sobre a estrutura das partículas também foi estudado. DRX após a calcinação evidenciou picos estreitos e bem definidos para todas as porcentagens molares (Figura 11).

Figura 11. Padrão de DRX da série de partículas Ca-Sr-HA (0-100% Sr^{2+}) após tratamento térmico (600°C por 8h). Os picos de difração da amostra 0% Sr^{2+} estão relacionados com o padrão (●) AMCSD 0002281 para HA pura. O aumento da quantidade de íons Sr^{2+} levou à formação de uma fase pura de estrôncio apatita (SrA) (▲) COD 9011132 como mostrado para 100% Sr^{2+} . Mistura de fases HA e SrA são observadas para a série (10-50% Sr^{2+}) com conversão total para SrA a partir de 70% Sr^{2+} . A linha tracejada indica o deslocamento da reflexão de Bragg (002) para menores valores de θ com o aumento da quantidade de Sr^{2+} .

As reflexões de Bragg da amostra 0% Sr^{2+} indicam a presença de uma única fase cristalina que corresponde a HA hexagonal ($\text{HA-Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (padrão 0002281 AMCSD). Uma notória evolução na estrutura cristalina após adição de Sr^{2+} pode ser

observada, até que em 100% Sr^{2+} , nova fase pura de estrôncio apatita hexagonal é obtida ($\text{SrA-Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (padrão 9011132 COD). Picos de HA e SrA (grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$) mostrando mistura de fase são observados até 50% Sr^{2+} , com conversão total a partir de 70% Sr^{2+} . Por fim, nota-se a ausência dos picos de difração relacionados à SrCO_3 (estroncianita), o que é consequência da decomposição do sal de carbonato em $\text{CO}_{2(g)}$ quando em altas temperaturas^{156,157}.

Segundo Zyman et al¹⁵⁴, os fosfatos de cálcio amorfos (ACP) são constituídos por clusters de fosfato de cálcio (CaP) com água em seus interstícios. Uma camada superficial contendo água e íons (Ca^{2+} , HPO_4^- e CO_3^{2-}) reveste a partícula amorfa, a qual é essencial para conversão de ACP ($\text{Ca/P}=1.5$) em HA ($\text{Ca/P}=1.67$), através da difusão de íons para o interior dos clusters. Uma vez que o processo de difusão é sensível a temperatura, isto explica a conversão das partículas amorfas (10-50% Sr^{2+}) em fases cristalinas a altas temperaturas^{143,144,155,158,159}. Além disto, o aumento na temperatura é responsável por diminuir a distorção do grupo fosfato e a energia interna, conduzindo a uma mudança na organização estrutural das partículas, o que suporta a obtenção dos picos mais estreitos e definidos para as amostras que já eram cristalinas (0, 70, 90 e 100% Sr^{2+})^{144,160,161}.

Figura 12. Efeitos ocasionados pela introdução de íons Sr^{2+} na estrutura cristalina das partículas tratadas termicamente (0-100% Sr^{2+}). **(a)** Deslocamento linear da reflexão de Bragg (002) com o aumento da porcentagem molar de Sr^{2+} , indicando um aumento da distância interplanar (d) e dos parâmetros de rede. **(b)** Razão c/a confirmando o aumento linear e anisotrópico de c (Å) em relação ao parâmetro a (Å).

Observando a linha tracejada da Figura 11 e a reflexão de Bragg (002) para as diferentes porcentagens molares na Figura 12-a, conclui-se que a incorporação de Sr^{2+} na estrutura cristalina provocou um deslocamento dos picos de difração para valores menores de 2θ , indicativo de um aumento na distância interplanar (d) e nos parâmetros de rede da

estrutura cristalina (Tabela 1). Este aumento é linear e anisotrópico, favorecendo c (Å) em relação ao parâmetro a (Å), como mostrado pela razão c/a (Tabela 1 e Figura 12-b). Estes fatos confirmam que Sr^{2+} foi inserido na estrutura da HA sem formação de nova fase, corroborando a ausência de estroncianita revelada anteriormente. Outros autores também reportaram o mesmo efeito pela introdução deste íon em HA e carbonato de cálcio^{124,143,144,159,162-164}.

O tamanho do cristalito das amostras tratadas termicamente foi calculado a partir da equação de Scherrer (equação 6). A reflexão de Bragg em torno de $25,9^\circ$ (002) foi ajustada com uma função pseudo-Voigt para definir sua largura total na metade da intensidade máxima β (FWHM), calculando assim o tamanho médio do cristalito ao longo do eixo c .

$$D_{hkl} = \frac{K \lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (6)$$

onde, D_{hkl} é o tamanho do cristalito, λ é o comprimento de onda da radiação Cu K α incidente, β é a largura total na metade da intensidade máxima do pico de Bragg, θ é o ângulo de difração na reflexão de Bragg e K é uma constante relacionada com a forma, para partículas esféricas esta é igual a 0,9.

Tabela 1. Posição (graus) e distância interplanar d (nm) correspondentes aos índices de Miller (002) e (310), tamanho do cristalito D_{hkl} (nm) e parâmetros de rede da célula unitária para as diferentes porcentagens molares de Sr^{2+} das partículas Ca-Sr-HA.

Sr^{2+}	(002)			(310)		Parâmetros de Rede		
	Posição (graus)	d (nm)	D_{hkl} (nm)	Posição (graus)	d (nm)	a (Å)	c (Å)	c/a
0	25,81	0,345	26,84	39,68	0,227	9,449	6,898	0,730
10	25,71	0,346	29,82	39,57	0,228	9,474	6,925	0,731
30	25,41	0,350	28,31	39,30	0,229	9,537	7,005	0,734
50	25,24	0,352	37,00	39,12	0,230	9,579	7,051	0,736
70	25,03	0,355	30,88	38,95	0,231	9,619	7,109	0,739
90	24,55	0,362	34,03	38,36	0,234	9,762	7,246	0,742
100	24,32	0,366	28,10	38,18	0,235	9,806	7,314	0,746

O tamanho médio do cristalito calculado pelo DRX está na faixa de 26-37 nm (Tabela 1). Os padrões de DRX sustentam a informação de que as amostras são compostas por pequenos cristalitos na faixa de nanômetros, uma vez que o pico de difração em torno de $25,9^\circ$ é alargado e pouco intenso. Nenhuma tendência foi observada para esta

propriedade com o aumento da porcentagem molar de Sr^{2+} , semelhantemente ao evidenciado por Frasnelli et al¹⁴⁴. Em contraste, outros autores reportaram decaimento do tamanho do cristalito para um mínimo em torno de 50% Sr^{2+} justificado pela maior desordem da apatita nesta condição^{143,146,159,162}, e um posterior aumento para maiores dimensões em quantidades de Sr^{2+} maiores^{143,162}.

De forma a se obter mais informações das partículas após o tratamento térmico seus grupos químicos foram investigados. Os espectros de infravermelho (Figura 13) apresentam bandas semelhantes entre as porcentagens molares analisadas, as quais correspondem ao grupo fosfato: (i) modo ν_4 em $\sim 567 \text{ cm}^{-1}$ (deformação angular assimétrica O–P–O), (ii) modo ν_4 em $\sim 603 \text{ cm}^{-1}$ (deformação angular simétrica O–P–O), (iii) modo ν_1 em $\sim 961 \text{ cm}^{-1}$ (estiramento simétrico P–O) e (iv) modo ν_3 em ~ 1040 e 1090 cm^{-1} (deformação angular assimétrica P–O)^{2,155}. Ao comparar com as partículas sem tratamento térmico um aumento na intensidade e definição destas bandas é notável, confirmando a maior organização estrutural das amostras após o tratamento térmico¹⁵³, como mostrado por DRX. Ainda, o aumento da temperatura é responsável pela remoção de água absorvida^{154,161,165,166}, como revelado pela diminuição da intensidade das bandas em ~ 1630 e $3000\text{-}3700 \text{ cm}^{-1}$ ¹⁵⁵.

Figura 13. Espectro FTIR das partículas (0-100% Sr^{2+}) após tratamento térmico evidenciando bandas de absorção típicas relacionadas aos grupos PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , OH^- e moléculas de H_2O .

A atenuação e ausência das bandas para os modos vibracionais ν_3 e ν_2 , respectivamente, do grupo CO_3^{2-} comprovam a menor quantidade deste ânion nas amostras¹⁶⁷. Esta evidência suporta a inexistência de estroncianita observada por DRX nas partículas após a calcinação. De fato, parte deste íon é eliminado até 600°C , entretanto, sua

eliminação completa só é demonstrada em temperaturas próximas de 900°C^{166,168,169}. Por este motivo, a presença de pequenas bandas em ~ 1450 e 1410 cm^{-1} indicam a substituição de PO_4^{3-} das partículas Ca-Sr-HA por CO_3^{2-} , nomeada substituição do tipo-B¹⁷⁰, a qual é predominante no mineral dos ossos e dentes¹⁷¹. A adição de íons Sr^{2+} influencia a distribuição de carga nas partículas, o que por sua vez afeta diretamente o tipo de substituição do ânion CO_3^{2-} ^{124,170}, assim como também reportado para o Mg^{2+} ¹⁵⁰. Ainda a esse respeito, outros estudos reportaram o favorecimento da substituição do tipo-B em apatitas substituídas por Sr^{2+} , indicando que este deve ser um mecanismo de compensação de carga¹⁴⁶.

Bandas de absorção em ~ 3572 e 633 cm^{-1} correspondem ao estiramento e deformação angular de grupo OH estrutural. A presença da primeira foi preservada até a incorporação de 30% Sr^{2+} , enquanto a segunda até 10% Sr^{2+} , com um decréscimo na intensidade em porcentagens molares maiores (50-100% Sr^{2+}), assim como reportado por outros estudos^{143,144,159,172}. Como revelado por Frasnelli et al¹⁴⁴ a introdução deste cátion provoca uma drástica mudança no ambiente químico do grupo OH. O modo de deformação angular é mais sensível a essa mudança¹⁷³, conduzindo a diminuição prévia na sua intensidade quando comparado ao modo de estiramento.

Adicionalmente, a diminuição na intensidade destas bandas está relacionada com o sítio ocupado pelo Sr^{2+} na estrutura da HA, uma vez que os íons Ca estão localizados em duas posições não-equivalentes¹⁴⁴. Em um dos sítios, Ca(I), quatro cátions estão ordenados em colunas no plano [001] e são coordenados por 9 oxigênios pertencentes a seis grupos PO_4^{3-} . Por sua vez, o sítio Ca(II) apresenta seis cátions localizados ao redor de canais de grupo hidroxila os quais formam triângulos equiláteros de cálcio perpendiculares ao eixo-c¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ (Figura 14).

Em quantidades muito pequenas de Sr^{2+} , o sítio Ca(I) é ocupado preferencialmente, uma vez que é um sítio maior¹⁷⁷ e possui distância Ca(I)-O maior, permitindo acomodar de uma maneira mais fácil um cátion grande¹⁴³. Entretanto, em proporções maiores (>10% Sr^{2+}), a menor distância Ca-Ca para o sítio I é responsável por aumentar a repulsão, favorecendo a acomodação dos íons na posição Ca(II)^{146,162,172,177}.

Embora mais favorável, a presença de ambos os cátions no sítio II ainda é capaz perturbar a rede cristalina, o que ocasiona um aumento da célula unitária ao longo do eixo-c, como já foi demonstrado. Este aumento provoca uma diminuição da densidade espacial

das ligações OH, através do deslocamento deste grupo em relação aos planos, os quais são perpendiculares ao eixo c e passam em $z = \frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ ^{144,172,177,178}. A diminuição da intensidade das bandas do grupo hidroxila é consequência destes acontecimentos.

Figura 14. (a) Vista da célula unitária hexagonal de HA quando projetada no plano horizontal. (b) Sítios Ca(II) localizados ao redor de canais de grupo hidroxila no eixo-c formando triângulos de cálcio. (c) A substituição de íons Ca por Sr^{2+} na posição Ca(II) é responsável por aumentar a célula unitária ao longo do eixo-c e diminuir a densidade espacial das ligações OH, o que conduz ao decréscimo da intensidade das bandas relacionadas a este grupo com o aumento da porcentagem molar de Sr^{2+} .

Deslocamento linear para menores frequências dos modos vibracionais ν_4 e ν_1 do grupo fosfato pode ser observado com o aumento da proporção de Sr^{2+} neste (Figura 15) e em outros estudos^{143,144}.

Figura 15. Deslocamento linear dos modos vibracionais (a) ν_1 e (b) ν_4 do grupo PO_4 com o aumento da porcentagem molar de Sr^{2+} , em conformidade com os resultados apresentados por DRX.

Uma vez que as vibrações são tratadas como osciladores harmônicos, suas frequências podem ser descritas por:

$$f = \frac{1}{c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (7)$$

onde c é a velocidade da luz no vácuo, k é a constante de força e μ é a massa reduzida dos dois átomos. Assim, com a maior substituição de Ca^{2+} por Sr^{2+} a massa reduzida aumenta, diminuindo a frequência das vibrações dos grupos fosfatos ligados a este cátion¹⁶². Ademais, Fowler¹⁷³ ressaltou que a diminuição das frequências também está relacionada com um decréscimo da energia de repulsão entre grupos fosfato, os quais estão mais separados pelo aumento da rede cristalina com a inserção do íon estrôncio.

A composição das amostras foi investigada (EDS) e revelou que a porcentagem molar de Sr^{2+} no sólido aumentou simultaneamente com o acréscimo deste íon na solução inicial, evidenciando a incorporação quantitativa de Sr^{2+} na estrutura, como já observado anteriormente pelo aumento linear dos parâmetros de rede (Tabela 1 e Figura 12-b) e o descolamento das bandas de absorção do grupo PO_4^{3-} (Figura 15). Estes fatos comprovam que o Sr^{2+} foi incorporado estruturalmente, e não apenas como um recobrimento da superfície dos cristais^{124,146}. Uma pequena deficiência de Sr^{2+} no produto quando comparado à solução pode ser constatada, como descrito previamente por outros autores^{144,179,180}. Ainda, a presença deste íon na amostra 0% Sr^{2+} não é surpresa, assim como observado por Li et al¹⁴⁶, uma vez que o estrôncio é um elemento traço presente na água e em outras fontes.

Tabela 2. Porcentagem (%) molar de Sr^{2+} incorporada nos sólidos finais tratados termicamente em contraste com a porcentagem (%) molar presente na solução preparada, conforme determinado por EDS.

% Sr^{2+} na solução	% Sr^{2+} no produto
0,0	0,9
10,0	4,0
30,0	15,7
50,0	33,8
70,0	50,6
90,0	76,7
100,0	96,8

Agregados de partículas nanométricas com morfologia esférica foram observados nas imagens de MEV para toda a série de Ca-Sr-HA, indicando que a presença de Sr^{2+} e a mudança na fase cristalina não tiveram efeito significativo na morfologia das amostras (Figura 16). A mesma tendência foi vista por Li et al¹⁴⁶, com partículas na forma de agulha. Em contraste, estudos recentes relataram mudanças na morfologia associadas à alteração na composição química da HA^{124,143}. Esses resultados distintos estão relacionados com as diferentes metodologias de preparo (sol-gel, hidrotermal, estado sólido, precipitação química, entre outras) e as condições de processamento das partículas¹²¹.

Figura 16. Imagens de MEV da série de partículas Ca-Sr-HA tratadas termicamente. Morfologias esféricas puderam ser observadas para todas as porcentagens molares de Sr^{2+} .

O crescimento dos cristais de HA é regido por ânions de coordenação $\text{Ca-P}_6\text{O}_{24}$ no eixo *c* e cátions OH-Ca_6 nos eixos *a* e *b*. Em sínteses com pH inicial abaixo de 9, a quantidade de íons OH^- disponível é pequena e a formação dos cátions OH-Ca_6 nos eixos *a* e *b* é retardada. O eixo *c* se desenvolve normalmente pelos ânions de coordenação nesta condição, conduzindo a formação de partículas com morfologia alongada. Por sua vez, pHs maiores que 10 estão associados com a rápida formação do cátion devido a maior quantidade de íons OH^- , resultando no crescimento dos diferentes eixos dos cristais com a

mesma velocidade¹⁸¹⁻¹⁸³. Como consequência, partículas com morfologias esféricas são observadas nesta condição, esclarecendo o resultado obtido neste estudo. Ainda, o tratamento térmico possui papel chave na morfologia das partículas sintetizadas por precipitação química por via úmida, sendo evidenciado preferencialmente morfologias esféricas em partículas tratadas com temperaturas maiores que 500°C¹⁸⁴.

A tabela 3 sumariza os valores de tamanho medidos por DLS, os quais estão de acordo com o observado por MEV. Assim como para a morfologia, nenhuma tendência evidente pode ser observada no tamanho das partículas com o aumento da quantidade de Sr²⁺. Duas distribuições de tamanho são encontradas para as partículas 0% Sr²⁺ e 50% Sr²⁺, com a maior população em ~100 nm e a menor em ~50 nm. As demais porcentagens molares apresentaram a maior parte das partículas na região de ~90 a 220 nm.

Tabela 3. Tamanho (nm) das partículas Ca-Sr-HA tratadas termicamente investigado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz.

% Sr ²⁺	Tamanho médio (nm)	Desvio Padrão (nm)	Índice de polidispersão
0.0	102,7	44,5	0,288
	49,2	7,0	
10.0	225,2	87,1	0,493
30.0	87,2	43,9	0,356
50.0	112,5	42,5	0,310
	41,2	8,0	
70.0	96,8	37,9	0,338
90.0	78,7	42,7	0,227
100.0	137,9	44,2	0,472

A diminuição de escala micrométrica para nanométrica aumenta a área e melhora as propriedades superficiais dos materiais, as quais são importantes, pois influenciam na interação inicial com proteínas e no processo de adesão celular. Nanopartículas de HA mostraram possuir 11% mais proteínas de soro bovino fetal adsorvidas por 1cm² quando comparadas com HA convencionais (micrométricas)^{185,186}. Além do mais, estudos *in vitro* mostraram maior adesão celular, proliferação de células ósseas e atividade de fosfatase alcalina na presença de nanopartículas de HA quando comparadas a HA convencional. Em contraste, células de osteosarcoma e outros tumores possuíram sua proliferação retardada e suprimida, respectivamente, na presença de HA nanoestruturada^{185,187-189}.

Apatitas biológicas na faixa de tamanho de nanômetros são encontradas no osso. Foi reportado que a desmineralização depende do tamanho da partícula e a dissolução de cristaltos em escala nanométrica é suprimida até em meios não-saturados, o que indica o papel fundamental destes no processo de biomineralização¹⁹⁰. Pelos motivos acima citados, partículas sintetizadas em escala nanométrica são atualmente mais desejáveis quando comparadas as convencionais, pois mimetizam as apatitas presentes no processo de biomineralização do osso, o que as torna mais biocompatíveis^{186,190}.

As propriedades de superfícies das partículas também foram estudadas. O potencial- ζ é um valor eletrocinético que reflete a distribuição de carga superficial, influenciado pela polarizabilidade dos íons adsorvidos, concentração iônica do fluido e carga superficial do material¹⁹¹. Neste contexto, ζ negativos foram obtidos para toda a série de Ca-Sr-HA. O aumento destes valores com o acréscimo da porcentagem molar de Sr^{2+} é notável, atingindo um máximo em 100% Sr^{2+} (Tabela 4). Visto que o Sr^{2+} apresenta maior tamanho quando comparado ao Ca^{2+} , este cátion é mais facilmente polarizável, o que conduz ao aumento do ζ reportado em porcentagens molares altas.

Semelhantemente, diversos outros estudos reportaram valores negativos de ζ para fosfatos de cálcio e apatitas sintéticas. Smeets et al¹⁹² evidenciaram que um compósito de β -TCP apresentava carga superficial de $-19,6 \pm 1,1$ mV. Por sua vez, Sadat-Shojai et al¹⁹³ obtiveram valores de -11,4 e -5,5 mV, respectivamente, para nanotubos e esferas de HA. Ainda, Palazzao et al¹⁹⁴ reportaram valor de $-21,2 \pm 1,4$ mV para hidroxiapatita deficiente em cálcio. Em contraste aos resultados anteriores, valores positivos também foram vistos para HA sinterizada ($+4,1 \pm 0,8$ mV), HA não sinterizada ($+15 \pm 1,1$) e β -TCP ($+2,4 \pm 0,4$)¹⁹⁵. Estas variações são consequências da metodologia de preparo das partículas, a qual é responsável por influenciar as propriedades superficiais. Ainda, na literatura foram encontrados valores negativos de ζ para o osso (-75 mV)^{138,195} e HA bovina ($-9,25 \pm 0,9$ mV)¹³⁸, indicando a similaridade das partículas sintetizadas com a apatita biológica.

Tabela 4. Ângulo de contato da água (θ), energia livre de superfície (γ_s) e suas componentes polar (γ^p) e dispersiva (γ^d), e potencial zeta (ζ) das partículas Ca-Sr-HA tratadas termicamente.

	θ (°)	γ_s (mJ m ⁻²)	γ^p (mJ m ⁻²)	γ^d (mJ m ⁻²)	ζ (mV)
0% Sr²⁺	5,8 ± 1,2	62,72 ± 0,18	29,32 ± 0,12	33,41 ± 0,13	-25,40 ± 0,95
10% Sr²⁺	3,6 ± 0,3	72,97 ± 0,12	42,42 ± 0,08	30,55 ± 0,10	-22,43 ± 3,20
30% Sr²⁺	3,4 ± 0,8	72,44 ± 0,07	39,16 ± 0,06	33,28 ± 0,03	-26,13 ± 0,90
50% Sr²⁺	3,7 ± 0,3	72,00 ± 0,05	40,26 ± 0,03	31,73 ± 0,03	-19,50 ± 1,47
70% Sr²⁺	3,4 ± 0,2	72,52 ± 0,14	45,05 ± 0,09	27,27 ± 0,11	-20,53 ± 0,30
90% Sr²⁺	4,4 ± 0,4	71,05 ± 0,04	37,65 ± 0,04	33,40 ± 0,02	-15,83 ± 2,48
100% Sr²⁺	2,9 ± 0,3	73,01 ± 0,12	43,52 ± 0,07	29,49 ± 0,09	-11,90 ± 2,54

Superfícies carregadas negativamente tem efeito positivo na nucleação em soluções supersaturadas que simulam o fluido corpóreo pois causam maior adsorção de íons Ca²⁺ atuando na formação de apatita. Além disto, a adsorção de Ca²⁺ atua na ancoragem de proteínas de adesão celular como a fibronectina, vitronectina e integrina, as quais são dependentes da ligação com um cátion divalente^{192,196,197}.

A adesão celular em um material também está diretamente relacionada com a carga superficial deste. *In vitro*, ativação da proliferação celular foi observada em superfícies de HA negativamente carregadas, com efeito oposto para as positivas¹⁹⁶. Ainda, uma mesma tendência foi notada *in vivo* através da maior formação óssea na presença de partículas negativamente carregadas, quando comparadas as positivamente carregadas e não carregadas (controle)¹⁹⁸. Estes fatos indicam que uma superfície negativa é capaz de aumentar a aposição de apatita, a proliferação celular e promover a osteogênese.

Assim como o potencial- ζ , a energia livre de superfície (γ_s) dita à adsorção de proteínas e adesão de células no material. Por esta razão, foi investigado como a introdução de íons Sr²⁺ muda a molhabilidade, a γ_s e suas componentes polares e dispersivas.

A γ_s para a partícula não substituída (0% Sr²⁺) foi próxima de 63 mJ.m⁻², semelhantemente ao observado para filmes de HA depositados em titânio¹⁹⁹, com maior contribuição da componente dispersiva (33,41 mJ.m⁻²) em relação a polar (29,32 mJ.m⁻²), assim como reportado por outros autores^{200,201}. Valores menores de γ_s total para HA sintética foram evidenciados por Redey et al²⁰⁰ e Lopes et al²⁰¹, sendo estes 44,0 e 46,7

mJ.m⁻², respectivamente, motivados pela componente polar inferior em relação ao nosso estudo. Nesse sentido, o aumento de γ_S em relação aos estudos citados anteriormente indica que a superfície da partícula sintetizada neste trabalho é mais reativa, e consequentemente, é capaz de promover melhores respostas biológicas.

Por sua vez, a incorporação de Sr²⁺ na estrutura da HA provocou um aumento na molhabilidade e na γ_S total do sólido mediante o aumento de sua componente polar, a qual contribuiu predominantemente para a energia livre de superfície. O primeiro evento que ocorre na interface tecido-biomaterial após a implantação é a adsorção de proteínas. Neste sentido, superfícies hidrofóbicas favorecem forte ligação com albumina, dificultando a adesão de proteínas de matriz extracelular (ECM)²⁰². O aumento do caráter hidrofílico do substrato é responsável pelo deslocamento da albumina e melhor afinidade por proteínas da ECM²⁰², como a fibronectina, uma das proteínas chave no processo de adesão celular. Adicionalmente, células cultivadas em superfícies hidrofóbicas mostraram menor expressão de subunidades α_v e β_3 de integrina, uma proteína de adesão presente na membrana celular. As superfícies hidrofílicas aumentam a expressão destas subunidades, indicando que a melhor adesão celular neste tipo de substrato pode ser mediada pelas integrinas^{203,204}. Mais importante, a proliferação de células é fortemente correlacionada com a energia de superfície do material, sendo preferencialmente demonstrada em substratos hidrofílicos²⁰⁵. Portanto, os resultados obtidos indicam que as partículas Ca-Sr-HA tratadas termicamente, preferencialmente as com Sr²⁺ em sua estrutura, podem melhorar a adsorção de proteínas, a adesão celular e sua proliferação.

4.2. Caracterização dos cimentos ósseos porosos à base de PMMA carregados com Ca-Sr-HA

Nesta etapa, 1 wt% das partículas Ca-Sr-HA tratadas termicamente foram inseridas na matriz de PMMA. Como mostrado na seção 3.3, as amostras de cimento ósseo foram nomeadas de acordo com a porcentagem molar de Sr²⁺ presente na partícula: controle (sem partícula), 10% Sr²⁺, 30% Sr²⁺, 50% Sr²⁺, 70% Sr²⁺, 90% Sr²⁺ e 100% Sr²⁺.

A quantidade de Ca-Sr-HA adicionada ao cimento foi estabelecida de acordo com resultados prévios reportados na literatura. Vallo et al²⁰⁶ e Serbetci et al¹¹⁸ notaram uma diminuição das propriedades de manuseio pelo aumento da viscosidade do cimento ao

adicionar quantidades superiores a 20% de HA. O aumento na viscosidade pode prejudicar a distribuição homogênea de partículas na matriz conduzindo a um decréscimo das propriedades mecânicas do cimento como evidenciado pela redução da resistência à tração, compressão e flexão em quantidades de HA superiores a 15%^{116,207}. Pelos motivos anteriormente citados, este estudo visou trabalhar com quantidade de partícula inferior as mencionadas, porém mantendo a faixa de doses terapêuticas de Sr^{2+} na regulação da atividade de osteoblastos/osteoclastos, com a finalidade de aumentar a bioatividade do material sem prejudicar as propriedades mecânicas e de manuseio deste.

4.2.1. Avaliação do tempo de secagem e da temperatura máxima de polimerização das amostras ($T_{\text{máx}}$)

Novas metodologias de preparo de cimentos ósseos envolvendo a adição de cerâmicas e de um reagente formador de poros surgem como uma alternativa para a diminuição do superaquecimento durante o processo de solidificação. Neste contexto, Castaldini et al¹¹⁵ reportaram que a introdução de 5% de HA em cimento comercial de PMMA conduziu uma diminuição na $T_{\text{máx}}$ de 80°C para valores próximos de 65°C. Por sua vez, Liu et al¹²⁷ observaram um decréscimo na $T_{\text{máx}}$ proporcional a quantidade de partículas de fosfato de cálcio adicionadas em cimento de PMMA. Um valor mínimo de 75°C foi evidenciado com a adição de 15% de fosfato de cálcio para este estudo. Embora estes autores reportem que a incorporação de partículas é responsável por reduzir a $T_{\text{máx}}$ dos cimentos ósseos, esta diminuição é notavelmente limitada e a necessidade de adicionar grandes quantidades de partículas para obtenção de $T_{\text{máx}}$ compatíveis com o corpo humano culminaria em propriedades mecânicas e de manuseio prejudicadas. Os resultados reportados anteriormente contrastam com os achados para o nosso estudo, no qual a incorporação de Ca-Sr-HA nos cimentos ósseos não promoveu mudança significativa da temperatura quando comparado ao controle, exceto para a amostra 90% Sr^{2+} (*, $p < 0.05$). De fato, a pequena quantidade de Ca-Sr-HA adicionada nas amostras dificulta a observação do efeito positivo reportado pelos estudos anteriores. Entretanto, diminuição na $T_{\text{máx}}$ também não foi constatada pela incorporação de 10% de nanopartículas de HA em cimento poroso de PMMA por Sa et al¹⁰² e pela adição de 7,7 e 14,3% de apatita sintética em cimentos de PMMA com alta e baixa viscosidade por Serbetci et al¹¹⁸.

Como mostrado na Figura 17, os valores de temperatura de polimerização obtidos para os cimentos porosos são significativamente menores quando comparados com os valores de 70-120°C reportados para polímero convencional (sem poros e partículas) e estão na faixa de 42,0 a 68,4°C, atenuando o risco de necrose térmica nos tecidos adjacentes. Esta diminuição de $T_{\text{máx}}$ em relação ao PMMA convencional está associada majoritariamente à criação de uma matriz porosa, igualmente evidenciada por outros autores^{92,102,103}, excluindo a influência das partículas Ca-Sr-HA na temperatura, como discutido anteriormente. Adicionalmente, todas as amostras estão de acordo com o padrão estabelecido para a ISO 5833, a qual especifica um valor máximo de 90°C.

Figura 17. Temperatura máxima de polimerização dos cimentos. Valores na faixa de 42,0 a 68,4°C foram encontrados, respeitando a especificação estabelecida pela ISO 5833 (< 90°C), como mostrado pela linha tracejada em vermelho. (* mostra diferença significativa em relação ao controle; $p < 0.05$).

Diversos outros autores analisaram a $T_{\text{máx}}$ em cimentos ósseos de fosfato de cálcio e acrílicos. Sa et al¹⁰² evidenciaram temperaturas entre 28,2-33,3°C dependentes da criação de uma matriz porosa. Por sua vez, valores maiores entre 87-110°C foram demonstrados por Serbetci et al¹¹⁸ em cimentos de baixa e alta viscosidade de PMMA contendo HA. Para cimentos de fosfato de cálcio à base de Sr-HA, valor máximo de 58,0°C foi encontrado²⁰⁸. Portanto, os resultados são variados e dependem da natureza do material, da quantidade de partícula incorporada e da porosidade das amostras.

Valores próximos a 48°C na interface cimento-osso foram evidenciados *in vivo*²⁰⁹. Fatores como a baixa condutividade térmica do cimento, a grande área superficial da interface e a circulação sanguínea *in vivo* impedem o grande aumento de temperatura. Neste sentido, valores ainda menores de temperatura de polimerização poderão ser encontrados *in vivo* para as amostras deste trabalho em questão, tornando mínimas as chances de danos térmicos.

As propriedades de manuseio (tempo de pega e cura) são resultados de suma importância clínica que determinam o período ideal no qual os cirurgiões devem manusear e posicionar a amostra no defeito ósseo. De acordo com a ISO 5833, é recomendado que cimentos para uso em massa apresentem tempo de pega médio e desvio em relação à média menor que 300 e 90 segundos, respectivamente. Nenhuma recomendação é feita para uso em seringa. Como mostrado na Figura 18, os valores médios de tempo de pega para todos os grupos estão dentro das exigências desta norma e encontram-se na faixa de 162 a 182 segundos.

Por sua vez, segundo a ISO 5833 os tempos de cura para uso em seringa e em massa devem estar entre 390 a 900 segundos e 180 a 900 segundos, respectivamente. Neste sentido, os valores obtidos cumprem as exigências da norma e estão na faixa de 491 a 590 segundos, indicando que as amostras podem ser empregues em ambos os tipos de uso. Nenhuma tendência nos tempos de pega e cura pode ser observada com a incorporação de Ca-Sr-HA nos cimentos, similarmente ao reportado por Sa. et al⁹⁴ com a adição de HA em PMMA.

Figura 18. (a) Tempo de pega e (b) tempo de cura médio dos cimentos ósseos controle e os demais contendo Ca-Sr-HA. As linhas tracejadas indicam as normas recomendadas pela ISO 5833.

Em contraste a estes resultados, Liu et al¹²⁷ evidenciaram diminuição no tempo de pega com o aumento da quantidade de partículas de fosfato de cálcio dopadas por Sr^{2+} em cimentos de PMMA. Estes mesmos autores verificaram que quanto maior a quantidade de partículas adicionadas aos cimentos maior o tempo de cura e menor a temperatura de polimerização, uma vez que a quantidade de calor liberado está associada à velocidade de polimerização⁹⁴. Resultado similar foi notado por Cui et al¹²⁶ com a inserção de diferentes porcentagens em massa (10, 20 e 30 %) de vidros bioativos substituídos por Sr^{2+} em matriz de PMMA. O aumento demasiado da incorporação de partículas leva a efeitos negativos nas propriedades de manuseio, verificando-se a necessidade de tempos muito longos para o endurecimento das amostras²⁰⁸, o que resulta no fluxo da massa de cimento *in vivo* após a implantação e consequentemente em respostas adversas nos tecidos adjacentes¹²⁷.

A não alteração da temperatura de polimerização observada por este trabalho após a inserção de Ca-Sr-HA explica a ausência de diferenças nos tempos de pega e cura das amostras dopadas em relação ao controle, visto que estes fatores estão intimamente interligados. Adicionalmente, as tendências descritas para os estudos anteriores não foram aqui observadas, pois as quantidades de partículas introduzidas nestas matrizes foram consideravelmente maiores quando comparadas a deste trabalho ($> 5 \text{ wt}\%$). Por fim, o período de manuseio obtido para as amostras deste trabalho é maior quando comparado a estudo prévio⁵⁷ indicando que o cirurgião possui tempo suficiente para manipular o cimento sem a necessidade de realizar procedimentos adicionais que aumentem o processo de polimerização, como o pré-resfriamento do cimento ou a diminuição da temperatura do local de operação¹⁰².

4.2.2. Avaliação morfológica dos corpos de prova por MEV

As imagens de MEV mostradas nas Figuras 19 e 20 confirmam a estrutura porosa dos cimentos. Notavelmente, a morfologia e distribuição dos poros obtidos através da metodologia de geração de gás é irregular (Figura 19 e Figura 20-a). O tamanho dos poros é variado e abrange uma ampla faixa que vai desde micrômetros até milímetros, similarmente ao reportado por Cimatti et al²¹⁰ utilizando a mesma metodologia de formação de poros. As imagens de MEV da Figura 19 também indicam poros menores no interior de

poros maiores (setas vermelhas), confirmando a criação de uma matriz porosa interconectada.

Figura 19. Imagens de MEV para as amostras 10 e 50 % Sr^{2+} . As setas em vermelho indicam poros menores no interior de poros maiores, confirmando a criação de uma matriz porosa interconectada.

Figura 20. Imagens de MEV para as amostras controle, 30% Sr^{2+} e 90% Sr^{2+} . (a) ampliação x60; (b) ampliação x350 e (c) ampliação x1500.

Com o aumento da magnificação das imagens (Figura 20-b e c, x350 e x1500) é notória a mudança superficial existente com a introdução de Ca-Sr-HA nos cimentos. A amostra controle, sem adição de partículas, apresenta uma superfície predominantemente lisa com ranhuras decorrentes do processo de usinagem (Figura 20-c). Em contraste, após

a introdução de Ca-Sr-HA as superfícies apresentam maior rugosidade e presença de agregados destas partículas (Figura 20-b e c).

Ainda, as imagens obtidas revelam a presença de partículas na superfície dos poros (Figura 21). A localização de Ca-Sr-HA favorece a sua biodisponibilidade *in vitro* e *in vivo*, permitindo liberação de íons Sr^{2+} no meio em que se encontra, o que pode estimular a formação de uma camada de apatita na interface do material com o tecido hospedeiro e aumentar a bioatividade. Além disto, a presença destas partículas conhecidamente osteocondutivas na superfície e dentro dos poros pode conduzir a ligação química direta entre o cimento e o osso¹⁰².

Figura 21. Imagens de MEV da amostra 10% Sr^{2+} . (a) ampliação x60; (b) ampliação x350; e (c) ampliação x350 evidenciando a presença de partículas na superfície dos poros (imagem colorida artificialmente).

4.2.3. Caracterização estrutural dos cimentos ósseos após a incorporação de Ca-Sr-HA pela técnica de DRX

A partir das observações realizadas por MEV, buscou-se confirmar a presença das partículas na superfície e nos poros das amostras. Com este fim, inicialmente foi realizada a caracterização estrutural por DRX da amostra controle evidenciando a presença de uma região amorfa proveniente da matriz polimérica e picos bem definidos de sulfato de bário (Figura 22). O sulfato de bário é um composto químico presente no componente sólido do kit De Puy® SmartSet MV Endurance com a finalidade de aumentar a radiopacidade do material. Inesperadamente, nos cimentos carregados com partículas Ca-Sr-HA picos de difração correspondentes a esta fase não foram notados. Estudos prévios suportam este achado uma vez que picos de difração correspondentes a fosfato de cálcio em matrizes de PMMA só foram observados na ausência de sulfato de bário e em quantidades muito elevadas destas partículas (36 e 100%)^{94,112}.

Figura 22. Espectro de DRX das amostras controle, 10% Sr^{2+} e 100% Sr^{2+} . Uma região amorfa e picos correspondentes a sulfato de bário (●) foram observados para todas as amostras analisadas. Os cimentos carregados com Ca-Sr-HA não evidenciaram os picos característicos destas partículas, como resultado da pequena quantidade de Ca-Sr-HA em comparação a de BaSO_4 .

4.2.4. Análise elementar e mapeamento

Para ganhar maiores informações sobre o cimento poroso de PMMA e as partículas inseridas nesta matriz, análise elementar por EDS foi realizada comprovando a presença e localização de Ca-Sr-HA.

Espectros elementares para três diferentes regiões de uma amostra de cimento ósseo (50% Sr^{2+}) estão mostrados na Figura 23. Claramente, a primeira região é representada por um círculo mais escuro (Figura 23-b) que consiste basicamente de C e O indicando a presença característica das esferas de PMMA²¹¹ que estavam originalmente no componente sólido do kit Depuy® SmartSet MV Endurance. Por sua vez, a região indicada na Figura 23-c não possui uma forma específica e é notavelmente mais clara quando comparada à anterior. Os elementos que constituem majoritariamente esta localização são C, O, Ba e S, indicando a presença de BaSO_4 e formação de uma nova matriz pela polimerização do PMMA. Adicionalmente, sinais menos intensos indicando Na, Ca, Sr e P confirmam que partículas Ca-Sr-HA estão situadas na superfície dos cimentos. A região selecionada na Figura 23-d apresenta sinal intenso de Na proveniente da adição de NaHCO_3 para geração de gás, e é representada por cristais de morfologia alongada.

Figura 23. Espectros de EDS obtidos para três regiões diferentes selecionadas na amostra 50% Sr^{2+} . (a) Espectro da região 1 apresentando basicamente os elementos C e O característicos do PMMA; (b) espectro da região 2 constituído majoritariamente por C, O, Ba e S indicando a presença de BaSO_4 e formação de nova matriz de PMMA; e (c) espectro da região 3 mostrando sinal intenso de Na.

O mapeamento de EDS das amostras 10% Sr^{2+} (Figura 24-a) e 90% Sr^{2+} (Figura 25-a) evidenciaram a presença de agregados de Ca-Sr-HA impregnados na matriz polimérica e na superfície dos poros, respectivamente. Espectros elementares obtidos para esta região estão de acordo com o tipo de partícula inserida no cimento de PMMA uma vez que sinais mais intensos para o elemento Sr são observados no grupo 90% Sr^{2+} (Figura 25-b) e sinais mais intensos para Ca são observados em 10% Sr^{2+} (Figura 25-b), com coexistência de ambos os elementos para as duas amostras.

Figura 24. Análise da composição elementar da amostra 10% Sr²⁺. (a) Mapeamento elementar evidenciando a presença de partículas Ca-Sr-HA impregnadas na matriz polimérica; e (b) espectro elementar com sinais mais intensos para Ca em relação a Sr confirmando a natureza desta partícula.

Figura 25. Análise da composição elemental da amostra 90% Sr^{2+} . (a) Mapeamento elemental evidenciando a presença de partículas Ca-Sr-HA na superfície dos poros (região escura); e (b) espectro elemental com sinais mais intensos para Sr em relação a Ca confirmando a natureza desta partícula.

4.2.5. Medida de variação de pH

Bicarbonato de sódio e ácido cítrico foram adicionados durante o preparo dos cimentos ósseos com a finalidade de gerar gás para criação de uma estrutura porosa. Os resultados evidenciados anteriormente por EDS indicam a possibilidade de existir bicarbonato de sódio não reagido, em vista disso, os potenciais efeitos destas substâncias no pH ao redor das amostras foram investigados. As medidas foram realizadas em meio de cultura celular na ausência de células eliminando os efeitos causados pelo crescimento celular.

Figura 26. Alteração do pH do meio de cultura (α -MEM) durante o período de 72 horas devido à imersão da amostra controle e as demais contendo Ca-Sr-HA.

Inicialmente, a inserção das amostras em α -MEM ocasionou um aumento abrupto no pH em um curto período, indicando a rápida liberação de NaHCO_3 neste meio (Figura 26). Após 5 horas de incubação, é notória a tendência de decaimento do pH com o tempo. O principal sistema de controle do pH no meio de cultura celular é o tampão bicarbonato, mostrado pelo equilíbrio abaixo (R5), mimetizando o corpo humano^{212,213}.

Em condições anormais, o aumento na quantidade de íons HCO_3^- conduz a formação de H_2CO_3 , um ácido fraco ($\text{pK}_a \sim 6.4$), capaz de se dissociar prontamente em $\text{H}_2\text{O}_{(l)}$ e $\text{CO}_{2(aq)}$ e ser liberado na forma de $\text{CO}_{2(g)}$. Neste contexto, a liberação inicial de

bicarbonato de sódio pelas amostras causa um aumento no pH, o qual decai com o tempo pela conversão deste excesso em $\text{CO}_{2(g)}$.

Após 48 horas de incubação, o pH torna-se praticamente constante para a maior parte das amostras, com valores finais (72 horas) variando de 7,4 a 7,9. Embora estudo prévio tenha reportado que o aumento do pH pode afetar diversos processos celulares vitais²¹⁴, o bicarbonato de sódio é conhecidamente utilizado em muitas situações clínicas, entre elas a parada cardíaca, a prevenção da insuficiência renal e em pacientes com acidose metabólica²¹⁵. Além do mais, estudos prévios mostraram aumento na síntese de colágeno e na proliferação de células osteoblásticas com o aumento do pH para valores de até 8,4^{216,217}. Ao contrário, a acidose metabólica é responsável por aumentar a atividade dos osteoclastos e a reabsorção do mineral ósseo²¹⁸. Nesse sentido, o rápido aumento de pH ocasionado pela presença de bicarbonato de sódio nas amostras de cimento ósseo não deve ser relacionado a efeitos clínicos adversos, diferentemente de outros polímeros sintéticos, como o PLGA e o PCL, no qual a degradação rápida conduz a formação de bioprodutos ácidos que afetam negativamente a viabilidade celular e a migração de células para o interior do biomaterial²¹⁹.

4.2.6. Avaliação morfométrica (3D) por Microtomografia Computadorizada (micro-CT)

Os cimentos ósseos foram avaliados quanto ao sucesso da criação de uma matriz porosa. Com esta finalidade, o volume total (TV) das amostras preparadas (volume do *bulk*) foi definido como o volume ocupado pelo cimento ósseo (CV) em somatória ao volume dos poros. Os poros são considerados os espaços vazios presentes no sólido. Dentre os parâmetros investigados encontram-se a fração do volume de cimento ósseo em relação ao volume total do *bulk* (CV/TV, %), a fração entre o volume dos poros e o volume total do *bulk* (porosidade total, % de CV/TV), o volume de cimento ósseo que está presente na superfície do biomaterial, chamado de superfície de cimento específica (CS/CV, %), o tamanho médio dos poros (Tb.Sp*, μm) e a porcentagem de distribuição (ou frequência) dos poros na matriz. A análise da porosidade total incluiu poros abertos (%) e poros fechados (%).

Figura 27. Parâmetros morfométricos obtidos para as amostras de cimento ósseo controle e as demais contendo Ca-Sr-HA, onde (a) CV/TV (%) é a fração do volume do cimento ósseo em porcentagem; (b) é a porosidade total (%) do material; (c) CS/CV (1/mm) é a superfície de cimento específica; (d) é o tamanho médio dos poros (μm); e (e) % de poros abertos e fechados. (*, **, ***, **** mostram diferença significativa em relação ao controle, onde $p < 0.05$; < 0.01 ; < 0.001 e < 0.0001 , respectivamente.).

Diminuição nos valores de CV/TV pode ser observada para os cimentos carregados com partículas Ca-Sr-HA em comparação ao controle (sem partículas) (Figura 27-a). Esta tendência foi estatística apenas para as amostras 10% Sr²⁺ (**, $p < 0.01$), 70% Sr²⁺ (*, $p < 0.05$) e 100% Sr²⁺ (*, $p < 0.05$). As amostras podem ser classificadas em quatro diferentes grupos de acordo com os resultados de CV/TV: (i) um grupo G1 que inclui as amostras controle; (ii) um grupo G2 que apresenta os menores valores de CV/TV e abrange as amostras 10, 70 e 100% Sr²⁺; (iii) um grupo G3 com valores de CV/TV similares ao controle, correspondendo as amostras 90% Sr²⁺; e por fim (iv) um grupo G4 com valores intermediários entre os grupos G2 e G3, onde está presente as amostras 30 e 50% Sr²⁺.

A diminuição de CV/TV reportada anteriormente é acompanhada pelo aumento na porosidade total dos cimentos carregados com partículas Ca-Sr-HA (Figura 27-b), visto que estas medidas são complementares. Novamente, diferença estatística em relação ao controle só foi observada para as amostras 10% Sr²⁺ (**, $p < 0.01$), 70% Sr²⁺ (*, $p < 0.05$) e 100% Sr²⁺ (*, $p < 0.05$) e o mesmo padrão de grupos descrito anteriormente é notável para esta propriedade. A Figura 27-b evidenciou que os materiais fabricados são altamente porosos, com pelo menos 65% de seu volume sendo constituído de poros. Li et al²²⁰ reportaram que o aumento da porosidade total de implantes de titânio para valores próximos de 70% conduziu há um maior crescimento ósseo *in vivo*. Por sua vez, Roy et al²²¹ criaram um gradiente de porosidade de 80 a 88% em scaffolds de PLGA carregados com β -TCP e observaram maior crescimento tecidual e formação óssea nas regiões de alta porosidade. Ainda, o revestimento de implantes dentários com titânio esponjoso de menor porosidade foi associado com uma diminuição no crescimento ósseo na região do fêmur e da mandíbula de cães²²². Portanto, o aumento na porosidade reportado para os cimentos ósseos contendo Ca-Sr-HA garante melhor habilidade de crescimento ósseo *in vivo* e deve estar relacionado com uma melhor osteointegração do biomaterial.

A porosidade total de um biomaterial inclui poros abertos e fechados. Os primeiros apresentam conexão com o ambiente externo por meio de outros poros, tornando-se acessíveis a gases e líquidos. Por sua vez, os poros fechados estão isolados pela matriz e não se interconectam com o ambiente externo²²³. Especificamente, os poros abertos possuem papel chave na interação biomaterial-osso, migração celular, vascularização e permeabilidade de fluidos²²⁴. A investigação destes parâmetros para as amostras fabricadas revelou que a maior parte da porosidade total está presente na forma de poros abertos para

todas as amostras (Figura 27-e). Diferença estatística em relação ao controle foi observada para as amostras 10% Sr^{2+} (**, $p < 0.01$), 70% Sr^{2+} (*, $p < 0.05$) e 100% Sr^{2+} (*, $p < 0.05$), as quais apresentaram maior porosidade aberta. Por sua vez, a amostra 90% Sr^{2+} estava associada com a presença estatística de mais poros fechados quando comparado ao controle (*, $p < 0.05$).

O volume de cimento que ocupa a área superficial (CS/CV, %) é estatisticamente menor para as amostras contendo Ca-Sr-HA em relação ao controle, exceto para 30% Sr^{2+} (Figura 27-c). Este resultado revela que a superfície destas amostras é menos recoberta, ou seja, apresenta mais poros, facilitando a entrada de suprimentos celulares e permitindo a população, vascularização e crescimento ósseo no interior do biomaterial. Assim, as amostras contendo Ca-Sr-HA se destacam quando comparadas ao controle. Neste parâmetro, os padrões de agrupamento descritos anteriormente não foram observados.

Os tamanhos médios dos poros evidenciados neste estudo encontram-se entre 650 a 1800 μm e são significativamente maiores para as amostras contendo Ca-Sr-HA em relação ao controle, com exceção de 90% Sr^{2+} (Figura 27-d). Mais uma vez as amostras aparentam seguir os grupos descritos para os parâmetros CV/TV (%) e porosidade total (%). Apesar deste parâmetro ser muito utilizado para descrever o tamanho dos poros, ele muitas vezes não é representativo da amostra, e o mais adequado é investigar a distribuição dos tamanhos dos poros dentro da matriz, como mostrado na Figura 28.

Figura 28. Porcentagem de distribuição (ou frequência) dos tamanhos dos poros nas amostras de cimentos controle e as demais contendo Ca-Sr-HA.

Todas as amostras investigadas apresentam maior frequência de poros na região de 500 μm . O valor máximo de tamanho evidenciado para amostra controle é de aproximadamente 2500 μm , entretanto, poros com este tamanho são encontrados com menos frequência neste tipo de amostra. A introdução de partículas Ca-Sr-HA nos cimentos ósseos aparenta diminuir a frequência de poros menores e aumentar a frequência de poros maiores, alcançando valores de até 5500 μm . O osso apresenta poros com diferentes tamanhos que abrangem desde 1 μm até centenas de micrômetros, e a criação de biomateriais com esta porosidade hierárquica, como reportado neste estudo, pode trazer vantagens no processo de regeneração óssea¹.

Grande controvérsia é reportada na literatura sobre o tamanho ideal dos poros para obtenção de melhor atividade osteoblástica e crescimento ósseo. Murphy et al.²²⁵ investigaram o efeito de matrizes de colágeno-glicosaminoglicanos com diferentes tamanhos de poros na resposta celular de osteoblastos. Seus resultados mostraram que o processo de adesão celular aparenta estar relacionado com poros pequenos (100 μm) devido o papel fundamental da área superficial neste evento, enquanto poros com aproximadamente 300 μm garantem melhor proliferação celular. Semelhantemente, Chang et al.²²⁶ reportaram efeito positivo na proliferação de células-tronco mesenquimais na presença de materiais à base de titânio com poros na faixa de 300-400 μm . O processo de diferenciação osteogênica destas células estava associado com a presença de poros de aproximadamente 200 μm , como resultado da melhor sensibilidade dos estímulos mecânicos-biológicos pelas células em poros menores. Por sua vez, Miño-Fariña et al.²²⁷ observaram que o preenchimento de defeitos metafisários em fêmur de rato com cimento ósseo poroso de fosfato de cálcio conduzia boa osteointegração periférica, mas pobre invasão óssea no interior do material. A porosidade do material fabricado neste estudo estava entre 100-300 μm . Assim, apesar de poros na faixa de 100-400 μm serem recomendados para efeito osteoindutor *in vivo*, o crescimento ósseo nesta condição está associado na maior parte das vezes apenas com a região periférica. Portanto, em defeitos ósseos grandes a utilização de biomateriais com poros maiores (acima de 2 mm) pode garantir uma invasão óssea massiva em seu interior, a qual é capaz de recuperar a vitalidade do tecido²¹⁰. De fato, Hirn et al.²²⁸ reportaram que o osso por si só possui habilidade de preencher até mesmo grandes cavidades. Deste modo, a utilização de materiais altamente porosos deve fornecer um ambiente favorável para o crescimento ósseo e atuar como um

suporte mecânico prevenindo os riscos de fraturas durante o processo de regeneração tecidual²¹⁰.

As propriedades acima investigadas mostraram grandes diferenças entre as amostras controle e as demais contendo partículas Ca-Sr-HA. Esta observação é justificada pela hidrofiliabilidade das partículas sintetizadas, como mostrado pelos resultados de molhabilidade e γ_s na Tabela 4 (seção 4.1). Uma vez que o cimento ósseo de PMMA é uma matriz hidrofóbica e que o processo de criação de poros envolve o uso de água e bicarbonato de sódio, as partículas Ca-Sr-HA altamente hidrofílicas estarão envolvidas com o processo de criação de poros na matriz. De fato, pode ser observado (Tabela 4-seção 4.1) que as partículas nomeadas 10, 70 e 100% Sr^{2+} apresentam maiores valores de γ_s^p e menor θ quando comparadas a partícula 90% Sr^{2+} , podendo ser classificadas como grupos distintos. As demais (30 e 50% Sr^{2+}) formavam um outro grupo que apresentava valores intermediários. Estas evidências suportam os padrões de agrupamento encontrados para as medidas de CV/TV, porosidade total e tamanho médio dos poros.

A técnica de micro-CT é baseada na interação de raios-X com a amostra por efeito fotoelétrico e Compton²²⁹. O primeiro tipo de interação envolve a colisão de um fóton incidente com um elétron de uma camada interna do átomo, resultando na ejeção de um fotoelétron. Um elétron mais externo ocupa o lugar do elétron ejetado e resulta na emissão de um raio-X característico. De modo geral, o efeito fotoelétrico está relacionado com o número atômico, tornando possível diferenciar a presença de compostos distintos em materiais, assim como observado pelo contraste nos raios-X de tecidos moles e duros²²⁹. Nesse contexto, seções transversais representativas das amostras escaneadas por micro-CT estão apresentadas na Figura 29. O menor volume de cimento ósseo e a maior porosidade das amostras contendo partículas Ca-Sr-HA quando comparadas ao controle (sem partículas) podem ser observados. Dentre as amostras, a 90% Sr^{2+} é a que mais se assemelha com a amostra controle, apresentando menor porosidade e poros menores (Figura 29-f). Ainda, as amostras 10, 70, 100% Sr^{2+} estão associadas à poros maiores (Figura 29-b, 29-e e 29-g), assim como evidenciado pela medida de tamanho médio dos poros. Por sua vez, as amostras 30 e 50% Sr^{2+} aparentam ter estruturas intermediárias em relação as amostras anteriores (Figura 29-c e 29-d). Portanto, o padrão de agrupamento anteriormente descrito para as medidas de CV/TV, porosidade total e tamanho médio dos poros pode ser observado nas seções transversais da Figura 29.

Figura 29. Seções transversais representativas das amostras escaneadas por micro-CT, onde (a) controle; (b) 10% Sr^{2+} ; (c) 30% Sr^{2+} ; (d) 50% Sr^{2+} ; (e) 70% Sr^{2+} ; (f) 90% Sr^{2+} ; e (g) 100% Sr^{2+} . As setas vermelhas indicam a presença das partículas na matriz do cimento ósseo.

As partículas Ca-Sr-HA incorporadas no cimento ósseo estão localizadas preferencialmente na superfície dos poros (setas vermelhas na Figura 29). Mais uma vez, esta localização é resultado da metodologia utilizada para criação de poros nestas matrizes. As partículas hidrofílicas são arrastadas pela água durante o processo de criação de poros e consequentemente ficam localizadas preferencialmente nesta região.

Reconstruções 3D representativas da amostra controle e das demais contendo Ca-Sr-HA estão mostradas na Figura 30. Foram realizados cortes nas estruturas 3D das amostras os quais permitiram a visualização tanto da região externa quanto da região interna dos cimentos ósseos. Pode-se observar que as amostras contendo partículas Ca-Sr-HA apresentam menor volume de cimento ósseo e maior porosidade, assim como mostrado pelos resultados morfométricos CV/TV e porosidade total na Figura 27-a e 27-b. Ainda, o volume de cimento que ocupa área superficial é visivelmente maior para a amostra controle em comparação com as demais, assim como evidenciado por CS/CV (Figura 27-c). Em vista disso dos resultados apresentados aqui, devido a maior porosidade, presença de poros abertos e menor volume de cimento ósseo na superfície, as amostras contendo Ca-Sr-HA aparentam ser mais promissoras para o processo de osteointegração *in vivo*.

Figura 30. Reconstruções 3D representativas das amostras, onde (a) controle; (b) 10% Sr^{2+} ; (c) 30% Sr^{2+} ; (d) 50% Sr^{2+} ; (e) 70% Sr^{2+} ; (f) 90% Sr^{2+} ; e (g) 100% Sr^{2+} .

4.2.7. Ensaio de compressão

A área dos biomateriais tem focado em fabricar materiais que imitem a matriz extracelular das células, com propriedades mecânicas intimamente próximas do tecido nativo em questão²³⁰. Neste sentido, a resistência mecânica dos substitutos ósseos produzidos é de suma importância e consequentemente, medidas de compressão são indispensáveis, uma vez esta é grande parte da direção de carga aplicada no osso e nos materiais com essa finalidade¹¹⁸.

Recentemente, estudos vêm reportando diferentes abordagens que visam melhorar as propriedades mecânicas dos cimentos ósseos convencionais, dentre estas, destaca-se a introdução de uma substância formadora de poros nesta matriz, como carboximetilcelulose^{103,112}, hialuronato de sódio⁹², bicarbonato de sódio⁹¹, entre outras¹⁰². Neste sentido, Boger et al⁹² relataram diminuição no módulo de Young (de 930 para 50 MPa) e na tensão de escoamento (de 39 para 1,3 MPa) quando adicionado 50% de solução aquosa de hialuronato de sódio na matriz de PMMA, contudo, análise por micro-CT revelou ausência de porosidade aberta nas amostras, a qual é de suma importância para

crescimento ósseo no interior da estrutura porosa. Por sua vez, cimentos porosos de PMMA-HA fabricados na presença de carboximetilcelulose (5%) foram investigados por Sa et al¹⁰², o qual observaram módulos de Young na faixa de 190 a 240 MPa e tensão de escoamento entre 7,5 a 9 MPa. Desfavoravelmente, a presença desta substância formadora de poros encobriu as partículas de HA, prejudicando o crescimento ósseo na microarquitetura do material. Devido às desvantagens anteriormente citadas, nosso estudo visou criar um material de alta porosidade e melhores propriedades mecânicas utilizando bicarbonato de sódio.

As amostras preparadas foram submetidas a testes de compressão e curvas de tensão versus deformação foram obtidas pelo sistema operante ao aplicar uma carga axial ao cilindro do cimento até que este fosse fraturado ou fosse atingido o limite de escoamento superior. Inicialmente, o material se comporta elasticamente e possui uma relação linear entre a tensão e a deformação (lei de Hooke) (equação 8):

$$\sigma = E \times \varepsilon \quad (8)$$

em que σ é a tensão (MPa), E é o módulo de Young (MPa) e ε a deformação.

A partir do limite de escoamento, qualquer tensão aplicada no material provoca deformação permanente, consoante com o surgimento da natureza plástica. Dentre os parâmetros que podem ser retirados deste ensaio encontram-se o módulo de Young, que indica a resistência do substituto, e a tensão máxima compressiva, representada pela tensão na qual ocorre a fratura do material após este ter se tornado plástico.

Os resultados de módulo de Young para todos os grupos estão apresentados na Figura 31-a e encontram-se entre 64-277 MPa. Estes valores são semelhantes aos reportados em estudos prévios para cimentos ósseos de PMMA dopados com fosfato de cálcio, os quais mostraram módulo de Young entre 24-240 MPa^{94,102,112}. A resistência mecânica obtida é próxima do osso vertebral esponjoso adulto (50-800 MPa)²³¹ e bovino⁹¹, indicando que este material mimetiza as propriedades mecânicas deste tecido, diminuindo o risco de fraturas em ossos adjacentes e afrouxamento asséptico pela formação de camada de tecido fibroso. Diminuição estatística do módulo de Young em relação ao controle pode ser observada para as amostras 10% Sr²⁺ (***, $p < 0.001$) e 100% Sr²⁺ (***, $p < 0.001$). Por sua vez, um aumento estatístico desta propriedade é evidenciado para 90% Sr²⁺ (*, $p < 0.05$).

Figura 31. Propriedades mecânicas dos cimentos ósseos. (a) módulo de Young (MPa) e (b) tensão máxima compressiva (MPa). (*, **, ***, **** mostram diferença significativa em relação ao controle, onde $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$ e $p < 0.0001$, respectivamente.).

Por sua vez, a tensão máxima compressiva para todos os grupos é mostrada na Figura 31-b e está entre ~2 a 7 MPa. Em particular, considerando os valores de 4-12 MPa para o osso esponjoso humano²³¹ e 8 MPa para o bovino⁹¹, os materiais sintéticos fabricados estão na faixa, ou na pior das hipóteses, próximos do limite inferior. Entretanto, uma vez que a finalidade do material está relacionada com a sua elasticidade, esta propriedade não possui relevância tão grande quanto a anterior, pois as amostras já se tornaram plásticas neste ponto. Diminuição estatística do módulo de Young em relação ao controle pode ser observada para as amostras 10% Sr^{2+} (***, $p < 0.001$), 70% Sr^{2+} (*, $p < 0.05$) e 100% Sr^{2+} (***, $p < 0.001$). Por sua vez, um aumento estatístico desta propriedade é evidenciado para 90% Sr^{2+} (*, $p < 0.05$).

De fato, as diferenças observadas anteriormente entre a amostra controle e as demais contendo Ca-Sr-HA são resultado das propriedades morfométricas evidenciadas na Figura 27 (seção 4.2.6). A maior porosidade total, tamanho médio dos poros e poros abertos para as amostras 10, 70 e 100% Sr^{2+} conduz a diminuição do módulo de elasticidade e da tensão máxima compressiva, assim como reportado por outros autores²³². Por sua vez, a maior presença de poros fechados para a amostra 90% Sr^{2+} aparenta ter papel crucial em suas propriedades mecânicas, sendo maiores até mesmo que o controle.

Ainda neste sentido, Cimatti⁹¹ reportou que cimento ósseo a base de PMMA preparado com kit De Puy® SmartSet MV Endurance na ausência de substâncias formadoras de poros e partículas Ca-Sr-HA apresentou valores de módulo de Young e

tensão máxima compressiva elevados, de 2342 e 76,89 MPa, respectivamente. A rigidez da matriz extracelular possui impacto pronunciado no perfil de diferenciação celular, como reportado previamente pelo melhor comprometimento de MC3T3-E1 em osteoblasto na presença de matrizes com rigidezes mais próximas do osso^{51,233}. Assim, uma vez que os cimentos porosos fabricados apresentam propriedades mecânicas similares ao osso e rigidez menor quando comparados ao cimento convencional descrito por Cimatti⁹¹, eles podem atuar no processo de diferenciação celular e no suporte mecânico de falhas ósseas, prevenindo o risco de fraturas durante o processo de regeneração tecidual. Estes resultados mostram que os materiais sintéticos fabricados são promissores como substitutos ósseos.

4.2.8. Estudo *in vitro* de liberação de Sr^{2+} e Ca^{2+}

A administração oral de sais de Sr deve ser reconsiderada uma vez que a biodisponibilidade dos íons ativos é de apenas 20% e a incorporação destes no tecido ósseo é menor que 1 para cada 10 íons Ca, dificultando a melhora nas propriedades ósseas através deste tipo de administração^{110,234}. Adicionalmente, a dissolução e liberação local de íons possui papel fundamental no processo de mineralização¹⁸⁹.

Pelos motivos citados anteriormente, a funcionalização de biomateriais com fármacos ou outras substâncias ativas, depositadas na superfície ou no *bulk*, vem ganhando destaque como sistema de liberação local controlada visando promover melhorias nos processos de cicatrização e formação óssea na interface osso-implante através de melhores dose-reposta¹¹⁰.

Em materiais porosos três regiões diferentes podem ser observadas na curva de liberação (Figura 32). A primeira está relacionada com uma liberação rápida (*burst release*, do inglês), na qual as partículas presentes nas superfícies externas ou em poros grandes próximos a superfície são liberadas. A segunda corresponde à liberação intermediária, controlada pelas características dos poros, como interconectividade, tamanho, distribuição e capacidade de difusão das partículas ao meio externo. Por fim, a última região (platô) é a liberação final proveniente dos poros mais profundos da amostra⁵⁶.

Figura 32. Processo de liberação de partículas em matrizes porosas. Inicialmente, uma liberação rápida de partículas presentes nas regiões mais externas é evidenciada. Em seguida, nota-se uma liberação intermediária dependente das propriedades dos poros. Ao fim, um platô é atingido e a liberação é controlada pelas partículas mais internas. (Imagem adaptada da referência 56).

O estudo da liberação de íons Sr^{2+} das amostras foi avaliado *in vitro* após imersão dos cimentos ósseos contendo Ca-Sr-HA em tampão PBS e meio de cultura (α -MEM), visando mimetizar o contato inicial *in vivo* entre o biomaterial e o fluido corporal. O perfil de liberação obtido (Figura 33) é semelhante ao mostrado na Figura 32, independente do meio de dispersão, indicando que para este tipo de íon a liberação é controlada em maior parte pela matriz na qual ele se encontra. No período inicial, as amostras foram capazes de disponibilizar altas quantidades de Sr^{2+} , seguida por posterior liberação lenta, responsável por fornecer pequenas doses deste íon até o fim do experimento. Estudo prévio reportou que matrizes a base de vidros bioativos substituídos por Sr^{2+} apresentam um platô na liberação deste íon após 60 minutos²³⁵, em contraste, as amostras deste trabalho atingiram o platô em períodos maiores (horas), indicando o maior potencial de liberação controlada deste tipo de matriz. Nesse sentido, os cimentos ósseos porosos sintetizados são promissores para liberação de íons de forma controlada e sustentada ao longo do tempo.

Assim como discutido anteriormente (Figura 12 e Tabela 1-seção 4.1.), a introdução de íons Sr^{2+} desestabiliza a estrutura da HA, conduzindo a um aumento nos parâmetros de rede e na distância interplanar. Esses efeitos são responsáveis pela maior solubilidade e taxa de degradação das partículas substituídas por Sr^{2+} , como reportado por

Christoffernsen et al²³⁶. Nesse sentido, os cimentos ósseos com partículas de maiores porcentagens molares apresentaram maior disponibilidade deste íon *in vitro* em PBS, assim como apresentado pela Figura 33-a, evidenciando que a liberação não é controlada apenas pela matriz, mas também pelo tipo de partícula presente nesta. A mesma tendência é notada em α -MEM, entretanto, uma inversão na amostra 100% Sr^{2+} ocorre, a qual pode ser explicada pela maior afinidade de proteínas do meio de cultura por amostras contendo elevado teor de Sr^{2+} , conduzindo a formação de uma camada sobre a superfície da amostra e retardando a liberação deste íon^{110,237}.

Figura 33. Perfil de liberação de íons Sr^{2+} das amostras de cimentos contendo Ca-Sr-HA imersas em: (a) tampão PBS e (b) α -MEM, por um período de 336 horas.

A porcentagem de Sr^{2+} liberada em relação a quantidade inicial presente nos cimentos ósseos foi calculada e está apresentada na Tabela 5. Notavelmente, durante o período estudado as amostras liberaram apenas uma pequena quantidade da porcentagem total, como mostrado pela liberação de $\sim 12,8\%$ para as amostras 10 e 90% Sr^{2+} no período de 336h em PBS, e um valor máximo de $26,9\%$ para a amostra 100% Sr^{2+} nas mesmas condições. Este resultado indica que pequenas doses locais podem ser sustentadas por um longo tempo *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, a disponibilidade deste íon aparenta ser prejudicada em meio de cultura (α -MEM), como observado pela liberação máxima de $6,6\%$ de Sr^{2+} para a amostra 10% Sr^{2+} dentre todas as amostras estudadas no período de 336h. Esta evidência é consistente com a formação de uma camada de proteínas e aminoácidos sobre a superfície dos cimentos, a qual responsável por dificultar a cinética de liberação do Sr^{2+} , como reportado por Rohnke et al¹¹⁰.

Tabela 5. Porcentagem (%) de Sr^{2+} liberado em função do tempo em PBS e α -MEM em relação a quantidade inicial (1 wt%) presente nas amostras de cimento.

Meio	Tempo (h)	Porcentagem de Sr^{2+} liberado em função do tempo					
		10% Sr^{2+}	30% Sr^{2+}	50% Sr^{2+}	70% Sr^{2+}	90% Sr^{2+}	100% Sr^{2+}
PBS	12	10,32	7,76	11,69	11,78	8,97	19,06
	72	12,05	13,53	13,58	14,47	11,68	24,98
	120	12,45	14,96	13,92	14,98	12,30	26,02
	168	12,56	15,35	14,04	15,19	12,54	26,44
	336	12,85	16,05	14,23	15,43	12,72	26,94
α -MEM	2	2,20	1,85	1,77	2,48	2,56	1,32
	6	3,20	2,58	2,47	3,28	3,41	1,88
	12	4,18	3,18	2,79	3,72	3,77	2,13
	24	4,69	3,41	2,98	3,91	3,93	2,26
	72	5,18	3,57	3,14	4,05	4,11	2,37
	120	5,80	3,96	3,19	4,40	4,05	2,72
	216	6,26	4,10	3,44	4,68	4,43	3,00
	336	6,60	4,25	3,57	4,85	4,65	3,25

As concentrações de Sr^{2+} atingidas neste trabalho no período de 336h encontram-se entre 0,2 a 2,2 mM para imersão em PBS e entre 0,2 a 0,9 mM para imersão em meio de cultura. Nesse contexto, os valores alcançados são eficazes para estimular a proliferação e diferenciação de osteoblastos (0.1 mM) e reduzir o número de osteoclastos maduros e sua atividade de reabsorção (1 mM), segundo as doses reportadas por Bonnelye et al¹³⁰.

O perfil de liberação dos íons Ca^{2+} *in vitro* foi avaliado em meio de cultura celular (α -MEM), como mostrado na Figura 34. Em contraste ao Sr^{2+} , a liberação deste íon não é dose-dependente, como mostrado pela liberação similar em um mesmo tempo para todos os grupos. Esse resultado é justificado pelo aumento da solubilidade das partículas na presença de Sr^{2+} , o que reflete na maior cinética de liberação não apenas deste íon, mas também do Ca^{2+} , assim como reportado por estudos prévios²³⁸⁻²⁴⁰. Adicionalmente, a disponibilidade inicial de íons Ca^{2+} é mais elevada quando equiparada ao primeiro, consoante com estudo prévio que reportou um perfil de liberação inicial rápido com posterior decaimento²⁴¹. Estudo recente evidenciou que o efeito melhorado na resposta de osteoblastos e na osteogênese ocasionado pela presença de Sr^{2+} só ocorre mediante altas concentrações de Ca^{2+} ²⁴². Ainda, o Sr^{2+} e o Ca^{2+} ativam mecanismos intracelulares distintos em osteoclastos, o que sugere que estes íons devem ter efeito aditivo na inibição da

reabsorção óssea por estas células¹³⁶. Portanto, a liberação de Sr^{2+} evidenciada, conjuntamente com as altas doses de Ca^{2+} encontradas, possuem grande potencial terapêutico para regeneração óssea.

Figura 34. Perfil de liberação de íons Ca^{2+} das amostras de cimentos contendo Ca-Sr-HA imersas em α -MEM por um período de 72 horas.

4.2.9. Avaliação *in vitro* da bioatividade dos cimentos ósseos

O efeito da presença das partículas Ca-Sr-HA contendo Sr^{2+} em diferentes porcentagens molares na bioatividade dos cimentos ósseos foi investigado através da imersão das amostras em solução que simula o pH e composição iônica do fluido corpóreo (SBF). Neste sentido, a formação de uma camada de apatita na superfície do material prevê a capacidade deste em se ligar com o tecido ósseo *in vivo*²⁴³.

Diversos estudos relataram que um período de exposição de 28 dias era necessário para observar a formação de camada de apatita neste tipo de material, uma vez que em tempos inferiores a este, só foi observada esta camada para porcentagens de fosfato de cálcio superiores a 400%^{94,112,126}. Adicionalmente, diminuição significativa na quantidade de íons cálcio em uma solução de SBF na presença de cimentos porosos de PMMA incorporados com hidroxiapatita foi notada apenas em uma exposição de 28 dias¹⁰². Sendo assim, as amostras permaneceram por um período de 28 dias em SBF e após esta exposição, elas foram retiradas da solução e avaliadas quanto a formação da camada de apatita em sua superfície.

Previamente à imersão em SBF, os grupos químicos presentes nos cimentos ósseos foram investigados por ATR-FTIR (Figura 35). Bandas características do polímero (PMMA) foram observadas para todas as amostras em: (i) 1732 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do éster; (ii) na faixa de $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$; (iii) em 1435 cm^{-1} advinda da vibração de $-\text{CH}_2$; (iv) em 1270 e 1240 cm^{-1} do modo vibracional de $\text{C}-\text{O}$ em conjunto com o de $\text{C}-\text{C}-\text{O}$; e (v) em 1190 e 1140 cm^{-1} proveniente do estiramento de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ²⁴⁴⁻²⁵⁰. A presença destas bandas nos espectros de cimentos carregados com Ca-Sr-HA é de grande importância, evidenciando que as partículas puderam ser inseridas na matriz polimérica sem provocar alterações químicas no PMMA. Adicionalmente, devido as bandas dominantes do polímero e a baixa concentração de partículas, ocorre sobreposição das bandas provenientes dos modos vibracionais do grupo fosfato e hidroxila das partículas Ca-Sr-HA , dificultando a observação destas no espectro de infravermelho.

Figura 35. Espectro FTIR da amostra de cimento controle e as demais contendo Ca-Sr-HA previamente à exposição ao SBF. Bandas características do polímero são observadas para todas as amostras comprovando que a introdução das partículas Ca-Sr-HA não provocou mudanças químicas no PMMA.

Após a imersão em SBF (Figura 36), todas as amostras apresentaram notório decréscimo na intensidade das bandas relacionadas a matriz polimérica quando comparado ao espectro da Figura 35 (antes da exposição ao SBF), com as maiores diminuições observadas na região de $1600\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ e $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$. Adicionalmente, mudança no

comportamento das bandas de absorção na região de 1300-900 cm^{-1} é verificada, principalmente pelo aumento da intensidade da banda em $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$, a qual corresponde ao modo vibracional ν_3 do grupo fosfato.

Figura 36. Espectro FTIR da amostra de cimento controle e as demais contendo Ca-Sr-HA após exposição ao SBF por 28 dias. Decréscimo na intensidade das bandas do PMMA e aumento da intensidade da banda correspondente ao modo vibracional ν_3 do grupo fosfato pode ser observada para todas as amostras, indicando a deposição de apatita na superfície dos materiais.

A fim de obter maiores informações sobre a tendência observada anteriormente, foram realizados os cálculos das intensidades relativas entre as bandas correspondentes ao grupo PO_4^{3-} ($\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$) e a banda C=O do polímero ($\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$) antes e após a exposição ao SBF. As razões calculadas estão mostradas na Tabela 6. Um aumento nesta razão foi observado para todos os grupos, confirmando a precipitação de uma camada de apatita na superfície dos materiais, o que garante a bioatividade destes *in vitro*.

Tabela 6. Razão entre as intensidades relativas das bandas de absorção no infravermelho referentes ao grupo PO_4^{3-} (1070 cm^{-1}) e C=O (1730 cm^{-1}) apresentadas nos espectros das amostras antes e após o SBF.

Grupos	Antes do SBF	Depois do SBF
Controle	0,28	0,52
10% Sr^{2+}	0,17	0,65
30% Sr^{2+}	0,26	0,46
50% Sr^{2+}	0,29	0,43
70% Sr^{2+}	0,54	16,04
90% Sr^{2+}	0,15	0,40
100% Sr^{2+}	0.65	21.67

Adicionalmente, os cálculos de porcentagens deste aumento foram realizados e estão mostradas na Figura 37. Notavelmente, a presença de maiores quantidades de Sr^{2+} nas matrizes de cimento ósseo aparentam acelerar o processo de deposição de apatita na superfície do material. De fato, a maior solubilidade das partículas na presença de maiores quantidades de Sr^{2+} é responsável por aumentar a cinética de precipitação desta camada, e consequentemente, melhorar a bioatividade dos materiais, assim como reportado em outros estudos²⁵¹⁻²⁵⁴.

Figura 37. Porcentagem da razão das intensidades relativas das bandas de absorção no infravermelho referentes ao grupo PO_4^{3-} (1070 cm^{-1}) e C=O (1730 cm^{-1}) para os cimentos contendo Ca-Sr-HA em relação ao cimento controle.

A morfologia das partículas precipitadas após a exposição ao SBF foi analisada e está mostrada na Figura 38. Na menor magnificação (Figura 38-a), é notória a similaridade entre

a superfície observada e as obtidas previamente à exposição (Figura 20). Entretanto, ao aumentar a magnificação (Figura 38-b) pode-se verificar a presença de partículas esféricas depositadas na superfície e no interior dos poros das amostras de cimento, as quais são responsáveis por criar uma nanotopografia porosa. Essas partículas são formadas por cristais nanométricos de morfologia alongada, como notado para as micrografias 38-d a 38-f. De acordo com estudos reportados previamente, essa morfologia é característica da precipitação de apatita em soluções que simulam o fluido corpóreo^{152,240}.

Figura 38. Imagens de MEV da amostra 10% Sr²⁺ após exposição ao SBF durante 28 dias. (a) ampliação x60; (b) ampliação x350; (c) ampliação x1500; (d) ampliação x3000; (e) ampliação x4000; e (f) ampliação x5000.

Os elementos analisados pelo mapeamento (Figura 39-a) mostram distribuição homogênea de Ca^{2+} , o que comprova deposição de apatita por toda extensão do cimento. O espectro elemental obtido por EDS (Figura 39-b) evidenciou a presença de sinais intensos de Ca, P e O, suportando os resultados anteriores que indicam a precipitação de apatita na superfície dos cimentos ósseos. Ainda, o pequeno conteúdo dos elementos C e Ba observado pelo espectro e o encobrimento desses elementos nos mapas corrobora com a diminuição das intensidades das bandas de absorção referentes aos grupos do polímero observadas por ATR-FTIR. O pequeno sinal de Mg apresentado no espectro elemental, e o maior valor de razão Ca/P encontrado para a apatita depositada nos cimentos ósseos em comparação com o valor 1,67 esperado para HA indicam que esta apresenta substituição dos íons Ca^{2+} por outros cátions, como por exemplo o Mg^{2+} , e também substituição do íon PO_4^{3-} por outros ânions, como o CO_3^{2-} e o HPO_4^{2-} 152,199, assemelhando-se a apatita biológica encontrada no tecido ósseo²⁵⁵.

Figura 39. Mapeamento e espectro elemental da amostra 10% Sr^{2+} após exposição à SBF. (a) Mapeamento elemental evidenciando precipitação de apatita na superfície do cimento ósseo; e (b) espectro elemental com sinais mais intensos para C, P e O.

4.2.10. Testes de viabilidade celular

Em vista dos resultados positivos de bioatividade *in vitro*, investigou-se o efeito da presença de Ca-Sr-HA na matriz dos cimentos ósseos em cultura de osteoblastos. Com este fim, a amostra controle (sem partículas) e as demais carregadas com partícula Ca-Sr-HA foram cultivadas durante 72 horas e 7 dias na presença de células de linhagem MC3T3-E1,

e a viabilidade celular foi determinada por teste de MTT. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 40.

Figura 40. Viabilidade celular (%) em relação ao cimento de PMMA sem partículas (controle) medida pelo teste de MTT após 72 horas (preto) e 7 dias (cinza). (* mostra diferença estatística em relação ao controle, onde $p < 0.05$).

Similarmente ao reportado na literatura^{159,235,256}, em período curto de incubação (72 horas), a adição de Ca-Sr-HA aos cimentos ósseos não ocasionou mudança significativa da viabilidade dos osteoblastos (Figura 40), independente da porcentagem molar de Sr^{2+} nas partículas incorporadas. Entretanto, após 7 dias de cultura um aumento da atividade metabólica dos osteoblastos foi observado para amostras 90 e 100% Sr^{2+} quando comparadas ao controle e as demais (*, $p < 0.05$), indicando proliferação melhorada nessas condições. Outros autores evidenciaram o efeito positivo ocasionado pela presença de Sr^{2+} na viabilidade celular após 7 dias de incubação^{179,235,257}. Manutenção da atividade osteoblástica foi observada para as demais amostras (10-70% Sr^{2+}) quando comparadas ao controle, confirmando a não citotoxicidade dos cimentos ósseos.

O resultado positivo observado para os cimentos ósseos 90 e 100% Sr^{2+} sugere que a maior concentração e liberação de íons Sr^{2+} durante a incubação é responsável por melhorar a atividade metabólica das células, indicando que este íon atua de maneira dose-dependente, assim como reportado previamente^{144,256}. Os estudos de perfil de liberação de Sr^{2+} descritos anteriormente (Figura 33) demonstraram que o meio de cultura celular na presença das amostras 90 e 100% Sr^{2+} possuía uma concentração de Sr^{2+} na faixa de 45 a 65 ppm, diretamente relacionada com o aumento da proliferação celular. Similarmente, Frasnelli et al¹⁴⁴ reportaram o mesmo efeito para concentração análoga de Sr^{2+} (62 ppm).

Ainda, os valores de concentração obtidos são menores ao reportado na literatura (210 $\mu\text{g/ml}$) para um efeito deletério na diferenciação de osteoblasto e expressão de sialoproteína óssea. Por último, estudo prévio mostrou que a presença de SrCl_2 em dose similar a quantidade de Sr^{2+} liberada nesse estudo não produzia aumento na proliferação de osteoblastos²⁵⁸, indicando que a ação deste íon é dependente do ambiente químico que este se encontra, e da ação conjunta com íon Ca^{2+} ^{159,242}.

A partir desses resultados, podemos afirmar que as partículas inseridas na matriz polimérica não ocasionam efeito citotóxico nas células. Adicionalmente, os cimentos ósseos fabricados são capazes de suportar o crescimento celular, comprovando a biocompatibilidade destes materiais. Por último, a disponibilidade de maiores concentrações de Sr^{2+} são capazes de aumentar a proliferação de osteoblastos *in vitro*.

Conclusões

Os cimentos ósseos à base de PMMA são muito utilizados devido sua estabilidade mecânica após implantação, baixo custo e características moldáveis. Entretanto, dentre as desvantagens deste material incluem sua alta temperatura de polimerização e alto módulo de Young, que podem ocasionar a formação de uma camada de tecido fibroso na interface osso-implante. Na maioria das vezes, essa interface é o “ponto fraco” responsável pela falha do cimento, pois não existe ancoragem entre o material e o osso.

Visando promover a osteointegração dos implantes à base de PMMA, o projeto inicialmente baseou-se na síntese de nanopartículas de hidroxiapatita substituídas por Sr^{2+} . A HA é conhecida por suas características bioativas, osteocondutoras e osteoindutoras, e a substituição dos íons Ca^{2+} por Sr^{2+} pode melhorar suas propriedades biológicas aumentando a formação óssea e diminuindo a reabsorção óssea.

Em princípio, a introdução de íons Sr^{2+} na estrutura da HA conduziu a formação de fases amorfas, as quais são conhecidas por sua maior solubilidade. Como o trabalho visava a obtenção de matrizes que liberassem Sr^{2+} de forma controlada e sustentada ao longo do tempo, as partículas passaram por um processo de tratamento térmico, obtendo assim fases cristalinas para todas as porcentagens molares. Nesse sentido, na ausência de Sr^{2+} a fase formada é indexada como hidroxiapatita hexagonal. Um aumento da porcentagem molar deste íon conduziu a uma evolução na estrutura cristalina com obtenção de nova fase pura em 100% de substituição, nomeada estrôncio apatita. O deslocamento dos valores de 2θ e das bandas de absorção referentes ao grupo fosfato confirmam que Sr^{2+} foi incorporado estruturalmente, e não apenas como um recobrimento da superfície dos cristais.

As partículas obtidas apresentavam tamanho na faixa de nanômetros, como evidenciado por MEV e DLS, mimetizando as apatitas biológica. Ainda, as propriedades superficiais eram auspiciosas para a ancoragem de proteínas, adesão e proliferação de células.

As partículas Ca-Sr-HA contendo Sr^{2+} em sua estrutura foram incorporadas na matriz do cimento ósseo durante seu preparo sem alteração na composição química do polímero. As medidas de tempo de pega e cura se mostraram ideais para manuseio do material para implantação sem necessidade de realizar técnicas adicionais que aumentem o processo de polimerização, como o pré-resfriamento do cimento ou a diminuição da temperatura do local de operação. A criação de uma matriz porosa conduziu a diminuição da temperatura de polimerização quando comparada ao cimento de PMMA convencional

(70-120°C), reduzindo as chances de necrose térmica dos tecidos adjacentes. Mais importante, a redução no módulo de Young e tensão máxima compressiva para valores próximos do osso esponjoso são capazes de oferecer estabilidade mecânica após implantação sem ocasionar re-fraturas em corpos vertebrais adjacentes.

Os cimentos ósseos fabricados apresentaram uma matriz porosa e interconectada adequada para o crescimento de tecido ósseo no *bulk* e na interface cimento-osso. A exposição destas amostras à solução que simula o fluido corpóreo *in vitro* conduziu a precipitação de apatita na superfície e no interior dos poros confirmando a capacidade destas em se ligar com o tecido ósseo *in vivo*. Adicionalmente, esta precipitação aparentava ser favorecida nas amostras com maiores porcentagens molares de Sr^{2+} .

O perfil de liberação de íons Sr^{2+} foi controlado pela matriz porosa e pela porcentagem molar da partícula inserida nesta estrutura. As amostras foram capazes de disponibilizar altas quantidades de Sr^{2+} , seguida por posterior liberação lenta, responsável por fornecer pequenas doses deste íon até o fim do experimento. No tempo estudado, apenas uma pequena porcentagem deste cátion havia sido liberada, confirmando que a liberação poderia ser sustentada por um longo período.

Os testes *in vitro* em cultura de osteoblastos indicaram que a inserção de partículas com maiores porcentagens molares de Sr^{2+} na matriz do cimento ósseo foram capazes de aumentar a proliferação celular quando comparado ao controle, consoante com a maior concentração durante liberação deste íon em meio de cultura. Esses resultados comprovam que a criação de uma matriz porosa e a inserção de partículas Ca-Sr-HA nos cimentos ósseos a base de PMMA podem promover a formação de uma interface osso-cimento e gerar estabilidade do implante a longo prazo *in vivo*.

Referências Bibliográficas

1. Salinas, A. J., Esbrit, P., & Vallet-Regí, M. A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair. *Biomater. Sci.* **1**, 40–51 (2013).
2. Nassif, N. *et al.* In Vivo Inspired Conditions to Synthesize Biomimetic Hydroxyapatite. *Chem. Mater.* **22**, 3653–3663 (2010).
3. Reznikov, N. *et al.* Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale. *Science* **360**, 1–10 (2018).
4. Reznikov, N., Shahar, R., & Weiner, S. Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomaterialia* **10**, 3815–3826 (2014).
5. Wang, W., & Yeung, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials* **2**, 224–247 (2017).
6. Mitov, M. Cholesteric liquid crystals in living matter. *Soft Matter* **13**, 4176–4209 (2017).
7. Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B., & Berman, H. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* **266**, 75–81 (1994).
8. Chang, S.-W., & Buehler, M. J. Molecular biomechanics of collagen molecules. *Materials Today* **17**, 70–76 (2014).
9. Orgel, J. P. R. O., San Antonio, J. D., & Antipova, O. Molecular and structural mapping of collagen fibril interactions. *Connective Tissue Research* **52**, 2–17 (2010).
10. Orgel, J. P. R. O. *et al.* Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 9001–9005 (2006).
11. Perumal, S., Antipova, O., & Orgel, J. P. R. O. Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 2824–2829 (2008).
12. Wang, Y. *et al.* The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nature Materials* **11**, 724–733 (2012).
13. Nudelman, F. *et al.* The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nature Materials* **9**, 1004–1009 (2010).
14. McNally, E. A. *et al.* A Model for the Ultrastructure of Bone Based on Electron Microscopy of Ion-Milled Sections. *PLoS ONE* **7**, 1–12 (2012).
15. Weiner, S., Traub, W., & Wagner, H. D. Lamellar Bone: Structure–Function Relations. *Journal of Structural Biology* **126**, 241–255 (1999).
16. Reznikov, N., Shahar, R., & Weiner, S. Three-dimensional structure of human lamellar bone: The presence of two different materials and new insights into the hierarchical organization. *Bone* **59**, 93–104 (2014).
17. Varga, P. *et al.* Investigation of the three-dimensional orientation of mineralized collagen fibrils in human lamellar bone using synchrotron X-ray phase nano-tomography. *Acta Biomaterialia* **9**, 8118–8127 (2013).
18. Buck, D. W., & Dumanian, G. A. Bone Biology and Physiology: Part I. The fundamentals. *Plastic and Reconstructive Surgery* **129**, 1314–1320 (2012).
19. Reznikov, N. *et al.* The 3D structure of the collagen fibril network in human trabecular bone: Relation to trabecular organization. *Bone* **71**, 189–195 (2015).
20. Wu, S. *et al.* Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **80**, 1–36 (2014).
21. Schrof, S. *et al.* 3D Raman mapping of the collagen fibril orientation in human osteonal lamellae. *Journal of Structural Biology* **187**, 266–275 (2014).
22. Giraud-Guille, M. M. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcified Tissue International* **42**, 167–180 (1988).
23. Razi, H. *et al.* Damage tolerance of lamellar bone. *Bone* **30**, 1–7 (2019).
24. Reisinger, A. G., Pahr, D. H., & Zysset, P. K. Principal stiffness orientation and degree of anisotropy of human osteons based on nanoindentation in three distinct planes. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **4**, 2113–2127 (2011).

25. Heřt, J., Fiala, P., & Petrtyl, M. Osteon orientation of the diaphysis of the long bones in man. *Bone* **15**, 269–277 (1994).
26. Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **3**, S131–S139 (2008).
27. Florencio-Silva, R. *et al.* Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 1-17 (2015).
28. Amadei, S. U. *et al.* A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab* **42**, 5-12 (2006).
29. Sebastian, A., & Loots, G. G. Genetics of Sost/SOST in sclerosteosis and van Buchem disease animal models. *Metabolism* **80**, 38–47 (2018).
30. CÔRREA, V. B. **Estudo da osteoclastogênese e da remodelação óssea durante a formação e erupção de molares de ratos tratados com bifosfonatos.** 2011. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
31. Feng, X., & Teitelbaum, S. L. Osteoclasts: New Insights. *Bone Research* **1**, 11-26 (2013).
32. Ramalho, A. C. R. *et al.* Por Que Estrógeno e Raloxifeno Melhoram a Densidade Mineral Óssea? Mecanismo de Ação do Estrógeno e de Um Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno (SERM) no Osso. *Arq Bras Endocrinol Metab* **44**, 471-481 (2000).
33. Väänänen, K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption—rationale for the design of new therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 959–971 (2005).
34. Rodríguez-Carballo, E., Gámez, B., & Ventura, F. p38 MAPK Signaling in Osteoblast Differentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **4**, 1-20 (2016).
35. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of Cellular Biochemistry* **99**, 1233–1239 (2006).
36. Stein, G. S., & Lian, J. B. Molecular Mechanisms Mediating Proliferation/Differentiation Interrelationships During Progressive Development of the Osteoblast Phenotype. *Endocrine Reviews* **14**, 424–442 (1993).
37. Morris, M. D., & Mandair, G. S. Raman Assessment of Bone Quality. *Clinical Orthopaedics and Related Research®* **469**, 2160–2169 (2010).
38. Rochefort, G. Y., Pallu, S., & Benhamou, C. L. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis International* **21**, 1457–1469 (2010).
39. Canalis, E. Growth factor control of bone mass. *Journal of Cellular Biochemistry* **108**, 769–777 (2009).
40. Turnbull, G. *et al.* 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials* **3**, 278–314 (2018).
41. Schumacher, M., & Gelinsky, M. Strontium modified calcium phosphate cements – approaches towards targeted stimulation of bone turnover. *Journal of Materials Chemistry B* **3**, 4626–4640 (2015).
42. Albrektsson, T., & Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* **10**, S96–S101 (2001).
43. Yu, X. *et al.* Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Adv. Healthcare Mater.* **4**, 1268-1285 (2015).
44. Stevens, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, **11**, 18–25 (2008).
45. Paterlini, T. T. *et al.* The role played by modified bioinspired surfaces in interfacial properties of biomaterials. *Biophysical Reviews* **9**, 683–698 (2017).
46. Chung, H. J., & Park, T. G. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 249–262 (2007).
47. Yang, J. *et al.* Plasma-treated, collagen-anchored polylactone: Its cell affinity evaluation under shear or shear-free conditions. *Journal of Biomedical Materials Research* **67A**, 1139–1147 (2003).

48. Hu, Y. *et al.* Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* **64A**, 583–590 (2003).
49. Ma, Z. *et al.* Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* **26**, 1253–1259 (2005).
50. Shih, Y.-R. *et al.* Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research* **26**, 730–738 (2011).
51. Zhang, Y. *et al.* Osteogenesis-Related Behavior of MC3T3-E1 Cells on Substrates with Tunable Stiffness. *BioMed Research International*, 1-10 (2018).
52. Sumner, D. R. Long-term implant fixation and stress-shielding in total hip replacement. *Journal of Biomechanics* **48**, 797–800 (2015).
53. Srivas, P. K. *et al.* Osseointegration assessment of extrusion printed Ti6Al4V scaffold towards accelerated skeletal defect healing via tissue in-growth. *Bioprinting* **6**, 8–17 (2017).
54. Shen, H. *et al.* A biomimetic 3D microtubule-orientated poly(lactide-co-glycolide) scaffold with interconnected pores for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B* **3**, 4417–4425 (2015).
55. Mourino, V., & Boccaccini, A. R. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *Journal of The Royal Society Interface* **7**, 209–227 (2009).
56. Parent, M. *et al.* Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance. *J. Control. Release* **252**, 1-17 (2017).
57. Ginebra, M.-P. *et al.* Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 1090–1110 (2012).
58. REY-VINOLAS, S.; ENGEL, E.; MATEOS-TIMONEDA, M. Polymers for bone repair. In: PAWELEC, M. K.; PLANELL, J. A. **Bone Repair Biomaterials**. Elsevier Inc., 2019. p. 179-197.
59. Fernandez-Yague, M. A. *et al.* Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **84**, 1–29 (2015).
60. O'Brien, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today Communications* **14**, 88-95 (2011).
61. Gao, C. *et al.* Current Progress in Bioactive Ceramic Scaffolds for Bone Repair and Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 4714–4732 (2014).
62. Roseti, L. *et al.* Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C* **78**, 1246–1262 (2017).
63. Magnan, B. *et al.* Acrylic bone cement: current concept review. *Musculoskelet Surg.* **97**, 93–100 (2013).
64. Smith, D. C. The genesis and evolution of acrylic bone cement. *Orthopedic Clinics of North America* **36**, 1–10 (2005).
65. Moradians, S. *et al.* Some mechanical properties including the repair strength of two self-curing acrylic resins. *Journal of Dentistry* **10**, 271–280 (1982).
66. DARVELL, B. W. Acrylic. In: DARVELL, B. W. **Materials Science for Dentistry**. Elsevier Inc., 2018. p. 121–142.
67. KÜHN, K.-D. Properties of Bone Cement: What is Bone Cement? In: BREUSCH, S.; MALCHAU, H. **The Well-Cemented Total Hip Arthroplasty**. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005. p. 52-59.
68. SA, Y. *et al.* Modifications of Poly(Methyl Methacrylate) Cement for Application in Orthopedic Surgery. In: CHUN, H. G. *et al.* **Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine**. Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2018. P. 119–134.
69. Spence, W. T. Form-Fitting Plastic Cranioplasty. *Journal of Neurosurgery* **11**, 219–225 (1954).
70. Webb, J. C. J., & Spencer, R. F. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **89-B**, 851–857 (2007).

71. Judet, J., & Judet, R. The use of an artificial femoral head for arthroplasty of the hip joint. *J Bone Joint Surg.* **32-B**, 166-73 (1950).
72. Charnley, J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg.* **42-B**, 28-30 (1960).
73. Smith, D. C. Medical and dental applications of cements. *Journal of Biomedical Materials Research* **5**(2), 189–205 (1971).
74. Chen, Y., Zhang, L., & Chen, G. Fabrication, modification, and application of poly(methyl methacrylate) microfluidic chips. *Electrophoresis* **29**, 1801–1814 (2008).
75. Suzuki, H. *et al.* Electrophysiological recordings of single ion channels in planar lipid bilayers using a polymethyl methacrylate microfluidic chip. *Biosensors and Bioelectronics* **22**, 1111–1115 (2007).
76. Suzuki, H. *et al.* Highly Reproducible Method of Planar Lipid Bilayer Reconstitution in Polymethyl Methacrylate Microfluidic Chip. *Langmuir* **22**, 1937–1942 (2006).
77. Li, X., King, T. A., & Pallikari-Viras, F. Characteristics of composites based on PMMA modified gel silica glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* **170**, 243–249 (1994).
78. Ouyang, Q. *et al.* Enhanced nonlinear optical and optical limiting properties of graphene/ZnO hybrid organic glasses. *Carbon* **67**, 214–220 (2014).
79. Ouyang, Q. *et al.* Graphene/MoS2 organic glasses: Fabrication and enhanced reverse saturable absorption properties. *Optical Materials* **35**, 2352–2356 (2013).
80. Park, S.-J., Cho, K.-S., & Choi, C.-G. Effect of fluorine plasma treatment on PMMA and their application to passive optical waveguides. *Journal of Colloid and Interface Science* **258**, 424–426 (2003).
81. Dragoman, D. *et al.* Waveguiding in PMMA photonic crystals. *Romanian Journal of Information Science and Technology* **12**, 308–316 (2009).
82. Gad, M. M. *et al.* PMMA denture base material enhancement: a review of fiber, filler, and nanofiller addition. *International Journal of Nanomedicine* **12**, 3801–3812 (2017).
83. Yu, W. *et al.* Reinforcement of denture base PMMA with ZrO2 nanotubes. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **32**, 192-197 (2014).
84. Kostic, M., Pejic, A., Igc, M., & Gligorijevic, N. Adverse reactions to denture resin materials. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **21**, 5298-5305 (2017).
85. He, Z. *et al.* Bone cements for percutaneous vertebroplasty and balloon kyphoplasty: Current status and future developments. *Journal of Orthopaedic Translation* **3**, 1–11 (2015).
86. Tseng, Y.-Y. *et al.* Percutaneous polymethylmethacrylate vertebroplasty in the treatment of pain induced by metastatic spine tumor. *Surgical Neurology* **70**, S78–S83 (2008).
87. Zuo, D. *et al.* Contemporary adjuvant polymethyl methacrylate cementation optimally limits recurrence in primary giant cell tumor of bone patients compared to bone grafting: a systematic review and meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology* **11**, 1-7 (2013).
88. Klenle, F. M., Inwards, C. Y., & Sim, F. H. Giant Cell Tumor of Bone. *Clin Orthop Relat Res* **469**, 591–599 (2011).
89. Filho, R. J.-G. *et al.* É a curetagem um método eficiente no tratamento dos tumores ósseos? *Rev Bras Ortop* **28**, 813-816 (1993).
90. Spasojevic, P. Poly(methyl methacrylate) denture base materials modified with ditetrahydrofurfuryl itaconate: Significant applicative properties. *J. Serb. Chem. Soc.* **80**, 1177–1192 (2015).
91. CIMATTI, B. **Desenvolvimento e caracterização de um cimento ósseo esponjoso para preenchimento de falhas ósseas . Análise morfométrica e ensaio mecânico.** 2012. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
92. Boger, A. *et al.* Properties of an injectable low modulus PMMA bone cement for osteoporotic bone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **86B**, 474–482 (2008).

93. Tang, Y. *et al.* Fabrication of injectable and expandable PMMA/PAASf bone cements. *Compos. Sci. Technol.* **146**, 203–209 (2017).
94. Sa, Y. *et al.* Physicochemical properties and in vitro mineralization of porous polymethylmethacrylate cement loaded with calcium phosphate particles. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **103**, 548–555 (2014).
95. Bozec, L., & Odlyha, M. Thermal Denaturation Studies of Collagen by Microthermal Analysis and Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* **101**, 228–236 (2011).
96. Wang, X. *et al.* The role of collagen in determining bone mechanical properties. *Journal of Orthopaedic Research* **19**, 1021–1026 (2001).
97. Homsy, C. A. *et al.* Some Physiological Aspects of Prosthesis Stabilization with Acrylic Polymer. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **83**, 317–328 (1972).
98. Berman, A. T. *et al.* Thermally Induced Bone Necrosis in Rabbits: Relation to Implant Failure in Humans. *Clin. Orthop. Relat. Res* **186**, 284–292 (1984).
99. Xu, H. H. *et al.* Calcium phosphate cements for bone engineering and their biological properties. *Bone Research* **5**, 1–19 (2017).
100. Ginebra, M. P. *et al.* New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomaterialia* **6**, 2863–2873 (2010).
101. Markovic, M., Takagi, S., & Chow, L. C. Formation of Macropores in Calcium Phosphate Cements through the Use of Mannitol Crystals. *Key Engineering Materials* **192**, 773–776 (2000).
102. Sa, Y. *et al.* Physicochemical properties and mineralization assessment of porous polymethylmethacrylate cement loaded with hydroxyapatite in simulated body fluid. *Materials Science and Engineering: C* **61**, 190–198 (2016).
103. Wang, L. *et al.* Characterization of porous polymethylmethacrylate space maintainers for craniofacial reconstruction. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **101B**, 813–825 (2013).
104. Sampath, U. *et al.* Fabrication of Porous Materials from Natural/Synthetic Biopolymers and Their Composites. *Materials* **9**, 991 (2016).
105. COSTANTINI, M.; BARBETTA, A. Gas foaming technologies for 3D scaffold engineering. In: DENG, Y.; KUIPER, J. **Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds**. Elsevier Inc., 2018. p. 127–149.
106. Hesarak, S., Moztarzadeh, F., & Sharifi, D. Formation of interconnected macropores in apatitic calcium phosphate bone cement with the use of an effervescent additive. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **83A**, 80–87 (2007).
107. Puska, M. *et al.* Morphological and mechanical characterization of composite bone cement containing polymethylmethacrylate matrix functionalized with trimethoxysilyl and bioactive glass. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **59**, 11–20 (2016).
108. Arcos, D., Ragel, C. V., & Vallet-Regí, M. Bioactivity in glass/PMMA composites used as drug delivery system. *Biomaterials* **22**, 701–708 (2001).
109. Letchmanan, K. *et al.* Mechanical properties and antibiotic release characteristics of poly(methyl methacrylate)-based bone cement formulated with mesoporous silica nanoparticles. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **72**, 163–170 (2017).
110. Rohnke, M. *et al.* Strontium release from Sr²⁺-loaded bone cements and dispersion in healthy and osteoporotic rat bone. *Journal of Controlled Release* **262**, 159–169 (2017).
111. Aghyarian, S. *et al.* In Vitro and In Vivo Characterization of Premixed PMMA-CaP Composite Bone Cements. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **3**, 2267–2277 (2017).
112. Lopez-Heredia, M. A. *et al.* A. Bulk properties and bioactivity assessment of porous polymethylmethacrylate cement loaded with calcium phosphates under simulated physiological conditions. *Acta Biomaterialia* **8**, 3120–3127 (2012).
113. Fini, M. *et al.* A bone substitute composed of polymethylmethacrylate and α -tricalcium phosphate: results in terms of osteoblast function and bone tissue formation. *Biomaterials* **23**, 4523–4531 (2002).

114. Zebarjad, S. M. *et al.* A Study on Mechanical Properties of PMMA/Hydroxyapatite Nanocomposite. *Engineering* **3**, 795–801 (2011).
115. Castaldini, A., & Cavallini, A. Setting properties of bone cement with added synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials* **6**, 55–60 (1985).
116. Dalby, M. J. *et al.* Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response. *Biomaterials* **23**, 569–576 (2002).
117. Dalby, M. *et al.* Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly(methylmethacrylate) cement. *Biomaterials* **22**, 1739–1747 (2001).
118. Serbetci, K., Korkusuz, F., & Hasirci, N. Thermal and mechanical properties of hydroxyapatite impregnated acrylic bone cements. *Polymer Testing* **23**, 145–155 (2004).
119. Tihan, T. G. *et al.* Effect of hydrophilic–hydrophobic balance on biocompatibility of poly(methyl methacrylate) (PMMA)–hydroxyapatite (HA) composites. *Materials Chemistry and Physics* **118**, 265–269 (2009).
120. Song, J., Malathong, V., & Bertozzi, C. R. Mineralization of Synthetic Polymer Scaffolds: A Bottom-Up Approach for the Development of Artificial Bone. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 3366–3372 (2005).
121. Sadat-Shojai, M., & Khorasani, M. T.; Dinpanah-khoshdargi, E.; Jamshidi, A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater.* **9**, 7591–7621 (2013).
122. Gasser, J. A., & Kneissel, M. Bone Physiology and Biology. *Bone Toxicology*, 27–94 (2017).
123. Karageorgiou, V., & Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474–5491 (2005).
124. Tovani, C. B. *et al.* Formation of stable strontium-rich amorphous calcium phosphate: Possible effects on bone mineral. *Acta Biomater.* **92**, 315–324 (2019).
125. Goñi, I. *et al.* Preparation and characterization of injectable PMMA-strontium-substituted bioactive glass bone cement composites. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **106**, 1245–1257 (2017).
126. Cui, X. *et al.* Enhanced osteointegration of poly(methylmethacrylate) bone cements by incorporating strontium-containing borate bioactive glass. *Journal of The Royal Society Interface* **14**, 1–13 (2017).
127. Liu, X. *et al.* A promising material for bone repair: PMMA bone cement modified by dopamine-coated strontium-doped calcium polyphosphate particles. *Royal Society Open Science* **6**, 1–10 (2019).
128. Matos, A. C. *et al.* Novel doped calcium phosphate-PMMA bone cement composites as levofloxacin delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* **490**, 200–208 (2015).
129. Dahl, S. *et al.* Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* **28**, 446–453 (2001).
130. Bonnelye, E., Chabadel, A., Saltel, F., & Jurdic, P. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone* **42**, 129–138 (2008).
131. Marie, P. J. Strontium as therapy for osteoporosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **5**, 633–636 (2005).
132. Mentaverri, R. *et al.* The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis. *The FASEB Journal* **20**, 2562–2564 (2006).
133. Hurtel-Lemaire, A. S. *et al.* The Calcium-sensing Receptor Is Involved in Strontium Ranelate-induced Osteoclast Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 575–584 (2008).
134. Takaoka, S. *et al.* The Calcium-sensing Receptor (CaR) is Involved in Strontium Ranelate-induced Osteoblast Differentiation and Mineralization. *Hormone and Metabolic Research* **42**, 627–631 (2010).
135. Fromigué, O. *et al.* Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **13**, 2189–2199 (2009).

136. Saidak, Z., & Marie, P. J. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. *Pharmacology & Therapeutics* **136**, 216–226 (2012).
137. Schumache, M., Hens, A., Rohnke, M., & Gelinsky, M. A novel and easy-to-prepare strontium(II) modified calcium phosphate bone cement with enhanced mechanical properties. *Acta Biomater.* **9**, 7536–7544 (2013).
138. Doostmohammadi, A. *et al.* Preparation, chemistry and physical properties of bone-derived hydroxyapatite particles having a negative zeta potential. *Materials Chemistry and Physics* **132**, 446–452 (2012).
139. Patil, S. *et al.* Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* **28**, 4600–4607 (2007).
140. Kokubo, T., & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **27**, 2907–2915 (2006).
141. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
142. Faria, A. N. *et al.* Estrogen and phenol red free medium for osteoblast culture: study of the mineralization ability. *Cytotechnology* **68**, 1623–32 (2016).
143. Bigi, A., Boanini, E., Capuccini, C., & Gazzano, M. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Inorganica Chimica Acta* **360**, 1009–1016 (2007).
144. Frasnelli, M. *et al.* Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. *Materials Science and Engineering C* **71**, 653–662 (2017).
145. Yantao, Z. *et al.* Doping of strontium into natural bone powder and further cell experiment. *Rare Metal Materials and Engineering* **43**, 2980–2984 (2014).
146. Li, Z. Y. *et al.* Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials* **28**, 1452–1460 (2007).
147. Farlay, D. *et al.* Long-Term Strontium Ranelate Administration in Monkeys Preserves Characteristics of Bone Mineral Crystals and Degree of Mineralization of Bone. *Journal of Bone and Mineral Research* **20**, 1569–1578 (2005).
148. Lagergren, C., & Carlström, D. Crystallography studies of calcium and strontium hydroxyapatites. *Acta chemica scandinavica* **11**, 545–550 (1957).
149. Kim, T.-G., & Park, B. Synthesis and Growth Mechanisms of One-Dimensional Strontium Hydroxyapatite Nanostructures. *Inorganic Chemistry* **44**, 9895–9901 (2005).
150. Terpstra, R. A.; Driessens, F. C. M. Magnesium in tooth enamel and synthetic apatites. *Calcified Tissue International* **39**, 348–354 (1986).
151. Al-Anezi, Khalid *et al.* Parameters affecting the solubility of carbon dioxide in seawater at the conditions encountered in MSF desalination plants. *Desalination*. **222**, 548–571 (2008).
152. Müller, L., & Müller, F. A. Preparation of SBF with different HCO_3^- content and its influence on the composition of biomimetic apatites. *Acta Biomaterialia* **2**, 181–189 (2006).
153. Termine, J. D., & Lundy, D. R. Vibrational spectra of some phosphate salts amorphous to X-ray diffraction. *Calcified Tissue Research* **15**, 55–70 (1974).
154. Zyman, Z., Rokhmistrov, D., & Glushko, V. Structural changes in precipitates and cell model for the conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite during the initial stage of precipitation. *Journal of Crystal Growth* **353**, 5–11 (2012).
155. Koutsopoulos, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research* **62**, 600–612 (2002).
156. Acosta, M. C. Strain Mechanisms in Lead-Free Ferroelectrics for Actuators. 2015. 175 p. Dissertação apresentada ao Institute of Materials Science - Technische Universität Darmstadt, Darmstadt, 2015.
157. Arvanitidis, I., Sichen, D., & Seetharaman, S. *et al.* The intrinsic thermal decomposition kinetics of SrCO_3 by a nonisothermal technique. *Metall and Materi Trans B* **28**, 1063–1068 (1997). doi:10.1007/s11663-997-0060-0
158. Liu, C., Huang, Y., Shen, W., & Cui, J. Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to

11. *Biomaterials* **22**, 301-306 (2001).
159. Aina, V. *et al.* Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties. *J Mater Sci: Mater Med* **23**, 2867–2879 (2012).
160. Guo, D. G. *et al.* Influences of Sr dose on the crystal structure parameters and Sr distributions of Sr-incorporated hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* **101B**, 1275-1283 (2013).
161. Lazić, S., Zec, S., Miljević, N., & Milonjić, S. The effect of temperature on the properties of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid. *Thermochimica Acta* **374**, 13–22 (2001).
162. O'Donnell, M. D. *et al.* Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites. *Acta Biomaterialia* **4**, 1455–1464 (2008).
163. Guo, D. G. *et al.* Influences of Sr dose on the crystal structure parameters and Sr distributions of Sr-incorporated hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* **101B**, 1275-1283 (2013).
164. Tanaca, H., & Nishimoto, S. Influence of strontium(II) on the formation of calcium hydroxyapatite prepared by hydrolyzing phenyl phosphate using alkaline phosphatase at 37°C. *Phosphorus Research Bulletin* **25**, 087-091 (2011).
165. Füredi-Milhofer, H. *et al.* Temperature-Programmed Dehydration of Hydroxyapatite. *Journal of Colloid and Interface Science* **70**, 1-9 (1979).
166. Kavitha, M. *et al.* Solution combustion synthesis and characterization of strontium substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Powder Technology* **253**, 129–137 (2014).
167. Ellies, L. G., Nelson, D. G. A., & Featherstone, J. D. B. Crystallographic structure and surface morphology of sintered carbonated apatites. *Journal of Biomedical Materials Research* **22**, 541–553 (1988).
168. Souza, T. S., Rangel, F. C., & Tokumoto, M. S. *et al.* Síntese, caracterização e modificação da hidroxiapatita com zinco para aplicação na reação de esterificação. *Revista Matéria* **24**, (2019).
169. THEOPANIDES, T. (Ed.). **Infrared Spectroscopy: Materials Science, Engineering and Technology**. Croatia: InTech, 2012. 978-953-51-0537-4.
170. Astala, R., & Stott, M. J. First Principles Investigation of Mineral Component of Bone: CO₃ Substitutions in Hydroxyapatite. *Chem. Mater.* **17**, 4125-4133 (2005).
171. Wilson, R. M., Elliott, J. C., Dowker, S. E. P., & Rodriguez-Lorenzo, L. M. Rietveld refinements and spectroscopic studies of the structure of Ca-deficient apatite. *Biomaterials* **26**, 1317–1327 (2005).
172. Terra, J. *et al.* The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 568–577 (2009).
173. Fowler, B. O. Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution. *Inorg. Chem.* **13**, 194-207 (1974).
174. Costa, A. C. F. M. *et al.* Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* **4.3**, 29-38 (2009).
175. Calderín, L., Stott, M. J., & Rubio, A. Electronic and crystallographic structure of apatites. *Physical Review B* **67**, 134106 (2003).
176. Haverty, D., Tofail, S. A. M., Stanton, K. T., & McMonagle, J. B. Structure and stability of hydroxyapatite: Density functional calculation and Rietveld analysis. *Physical Review B* **71**, 094103 (2005).
177. Hughes, J. M., & Cameron, M.; Crowley, K. D. Ordering of divalent cations in the apatite structure: Crystal structure refinements of natural Mn- and Sr-bearing apatite. *American Mineralogist* **76**, 1857-1862 (1991).
178. Sudarsanan, K., & Young, R. A. Structure of strontium hydroxide phosphate, Sr₅(PO₄)₃OH. *Acta Cryst.* **B28**, 3668-3670 (1972).
179. Capuccini, C. *et al.* Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser

- deposition : In vitro osteoblast and osteoclast response. *Acta Biomater.* **4**, 1885–1893 (2008).
180. Kaygili, O. *et al.* Strontium substituted hydroxyapatites: Synthesis and determination of their structural properties, in vitro and in vivo performance. *Materials Science and Engineering C* **55**, 538–546 (2015).
181. Son, K. D., & KIM, Y.-J. pH effect on the characteristics of mineralized self-assembled polymeric nanocomposites as controlled drug release carriers. *Journal of the Ceramic Society of Japan* **123**, 744–750 (2015).
182. Zhu, Y. *et al.* Nucleation and growth of hydroxyapatite nanocrystals by hydrothermal method. *AIP Advances* **8**, 1-11 (2018).
183. Wang, P. *et al.* Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process. *Powder Technology* **203**, 315–321 (2010).
184. Pan, Y., & Xiong, D. Influence of Dispersant and Heat Treatment on the Morphology of Nanocrystalline Hydroxyapatite. *Journal of Materials Engineering and Performance* **19**, 1037–1042 (2009).
185. Balasundaram, G., Sato, M., & Webster, T. J. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials* **27**, 2798–2805 (2006).
186. Dorozhkin, S. V. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomaterialia* **6**, 715–734 (2010).
187. Li, B., Guo, B., Fan, H., & Zhang, X. Preparation of nano-hydroxyapatite particles with different morphology and their response to highly malignant melanoma cells in vitro. *Applied Surface Science* **255**, 357–360 (2008).
188. Cai, Y. *et al.* Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. *J. Mater. Chem.* **17**, 3780-3787 (2007).
189. Chan, C. K. *et al.* Biomimetic nanocomposites for bone graft applications. *Nanomedicine (Lond.)* **1**, 177–188 (2006).
190. Tang, R. *et al.* Dissolution at the Nanoscale: Self-Preservation of Biominerals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 2697–2701 (2004).
191. Cruz, M. A. *et al.* Calcium carbonate hybrid coating promotes the formation of biomimetic hydroxyapatite on titanium surfaces. *Applied Surface Science* **370**, 459–468 (2016).
192. Smeets, R. *et al.* A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation. *Head & Face Medicine* **8**, 1–8 (2009).
193. Sadat-Shojai, M. *et al.* Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application. *Dental Materials* **26**, 471–482 (2010).
194. Palazzo, B. *et al.* Amino acid synergetic effect on structure , morphology and surface properties of biomimetic apatite nanocrystals. *Acta Biomater.* **5**, 1241–1252 (2009).
195. Smith, I. O., Baumann, M. J., & McCabe, L. R. Electrostatic interactions as a predictor for osteoblast attachment to biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res. A* **70**, 2–7 (2004).
196. Ohgaki, M. *et al.* Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* **57**, 366-373 (2001).
197. Hieda, J. *et al.* Relationships between surface energy and charge of surface-modified titanium and HAp formation. *Applied Surface Science* **465**, 509-516 (2019).
198. Teng, N. C. *et al.* A New Approach to Enhancement of Bone Formation by Electrically Polarized Hydroxyapatite. *J. Dent. Res.* **80**, 1925-1929 (2001).
199. De Souza, I. D. *et al.* Formation of carbonated hydroxyapatite films on metallic surfaces using dihexadecyl phosphate–LB film as template. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **118**, 31–40 (2014).
200. Redey, S. A. *et al.* Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: Relationship to surface energies. *Journal of Biomedical Materials Research* **45**, 140–147 (1999).
201. Lopes, M. A. *et al.* Hydrophobicity, surface tension, and zeta potential measurements of glass-

- reinforced hydroxyapatite composites. *Journal of Biomedical Materials Research* **45**, 370-375 (1999).
202. Arima, Y., & Iwata, H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* **28**, 3074–3082 (2007).
203. Lim, J. Y. *et al.* Integrin Expression and Osteopontin Regulation in Human Fetal Osteoblastic Cells Mediated by Substratum Surface Characteristics. *Tissue Engineering* **11**, 19–29 (2005).
204. Tzoneva, R., Faucheux, N., & Groth, T. Wettability of substrata controls cell–substrate and cell–cell adhesions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1770**, 1538–1547 (2007).
205. Lim, J. Y. *et al.* Systematic variation in osteoblast adhesion and phenotype with substratum surface characteristics. *Journal of Biomedical Materials Research* **68A**, 504–512 (2004).
206. Vallo, C. I. *et al.* Polymethylmethacrylate-Based Bone Cement Modified with Hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* **48**, 150–158 (1999).
207. Gratiela, T. T., Ionita, M. D., Popescu, R. G., & Iordachescu, D. Effect of hydrophilic-hydrophobic balance on biocompatibility of poly(methyl methacrylate) (PMMA)-hydroxyapatite (HA) composites. *Materials Chemistry and Physics* **118**, 265–269 (2009).
208. Cheung, K. M. C. *et al.* Vertebroplasty by Use of a Strontium-Containing Bioactive Bone Cement. *Spine* **30**, 84–91 (2005).
209. Reckling, F. W., & Dillon, W. L. The bone-cement interface temperature during total joint replacement. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **59**, 80-82 (1977).
210. Cimatti, B. *et al.* Physical and mechanical characterization of a porous cement for metaphyseal bone repair. *Acta Ortopédica Brasileira* **23**, 197–201 (2015).
211. Jacobs, E. *et al.* Synthesis and characterization of a new vertebroplasty cement based on gold-containing PMMA microspheres. *Biomaterials* **82**, 60-70 (2016).
212. Alka, K., & Casey, J. R. Bicarbonate transport in health and disease. *IUBMB Life* **66**, 596–615 (2014).
213. Elkinton, J. R. Whole Body Buffers in the Regulation of Acid-Base Equilibrium. *Yale J Biol Med.* **29**, 191–210 (1956).
214. PUTNAM, R. W. Intracellular pH Regulation. In SPERELAKIS, N. [ed.]: *Cell Physiology Source Book, 2nd ed.* San Diego, CA: 1997, Academic, p. 303–321.
215. Mirrakhimov, A. E. *et al.* The Role of Sodium Bicarbonate in the Management of Some Toxic Ingestions. *International Journal of Nephrology*, 1-8 (2017).
216. Galow, A.-M. *et al.* Increased osteoblast viability at alkaline pH in vitro provides a new perspective on bone regeneration. *Biochemistry and Biophysics Reports* **10**, 17–25 (2017).
217. Ramp, W. K., Lenz, L. G., & Kaysinger, K. K. Medium pH modulates matrix, mineral, and energy metabolism in cultured chick bones and osteoblast-like cells. *Bone and Mineral* **24**, 59–73 (1994).
218. Bushinsky, D. A. Acid-base imbalance and the skeleton. *European Journal of Nutrition* **40**, 238–244 (2001).
219. Sung, H.-J. *et al.* The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* **25**, 5735–5742 (2004).
220. Li, J. *et al.* Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition. *Biomaterials* **28**, 2810–2820 (2007).
221. Roy, T. D. *et al.* Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. *Journal of Biomedical Materials Research* **66A**, 283–291 (2003).
222. Story, B. J. *et al.* In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating. *Int J Oral Maxillofac Implants* **13**, 749-57 (1998).
223. Miao, X., & Sun, D. Graded/Gradient Porous Biomaterials. *Materials* **3**, 26–47 (2010).
224. Bartoš, M., Suchý, T., & Foltán, R. Note on the use of different approaches to determine the pore sizes of tissue engineering scaffolds: what do we measure? *BioMedical Engineering OnLine* **17** (2018).
225. Murphy, C. M., Haugh, M. G., & O'Brien, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment,

- proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 461–466 (2010).
226. Chang, B. *et al.* Influence of pore size of porous titanium fabricated by vacuum diffusion bonding of titanium meshes on cell penetration and bone ingrowth. *Acta Biomaterialia* **33**, 311–321 (2016).
 227. Miño-Fariña, N. *et al.* Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction of a macroporous calcium phosphate bone cement for the repair of a critical size defect in the femoral condyle. *The Veterinary Journal* **179**, 264–272 (2009).
 228. Hirn, M. *et al.* Bone defects following curettage do not necessarily need augmentation. *Acta Orthopaedica* **80**, 4–8 (2009).
 229. Racine, D. *et al.* Dual-Energy CT: Basic Principles, Technical Approaches, and Applications in Musculoskeletal Imaging (Part 1). *Seminars in Musculoskeletal Radiology* **19**, 431–437 (2015).
 230. Tran, T. T., Hamid, Z. A., & Cheong, K. Y. A Review of Mechanical Properties of Scaffold in Tissue Engineering: Aloe Vera Composites. *Journal of Physics: Conf. Series* **1082**, 1–6 (2018).
 231. Banse, X., Sims, T. J., & Bailey, A. J. Mechanical Properties of Adult Vertebral Cancellous Bone: Correlation With Collagen Intermolecular Cross-Links. *J Bone Miner Res* **17**, 1621–1628 (2002).
 232. Park, S. *et al.* 3D polycaprolactone scaffolds with controlled pore structure using a rapid prototyping system. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **20**, 229–234 (2008).
 233. Leipzig, N. D.; Shoichet, M. S. The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior. *Biomaterials* **30**, 6867–6878 (2009).
 234. Tovani, C. B. *et al.* Sr²⁺-Substituted CaCO₃ Nanorods: Impact on the Structure and Bioactivity. *Cryst. Growth Des.* **18**, 2932–2940 (2018).
 235. Gentleman, E. *et al.* The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials* **31**, 3949–3956 (2010).
 236. Christoffersen, J. *et al.* Effects of Strontium Ions on Growth and Dissolution of Hydroxyapatite and on Bone Mineral Detection *Bone* **20**, 47–54 (1997).
 237. Rohnke, M. *et al.* Mass spectrometric monitoring of Sr-enriched bone cements—from in vitro to in vivo. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 8769–8780 (2013).
 238. Landi, E. *et al.* Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement. *Acta Biomaterialia* **3**, 961–969 (2007).
 239. Ni, G. X. *et al.* The effect of strontium incorporation in hydroxyapatite on osteoblasts in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* **22**, 961–967 (2011).
 240. Hesarak, S. *et al.* Mechanical and In Vitro Biological Properties of Hydroxyapatite Bioceramics Reinforced with Strontium-Containing Nano-Bioactive Glass. *Current Nanoscience* **8**, 612–622 (2012).
 241. Montesi, M. *et al.* Sr-substituted bone cements direct mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteoclasts fate. *PLOS ONE* **12**, 1–13 (2017).
 242. Xie, H. *et al.* Microenvironment construction of strontium–calcium-based biomaterials for bone tissue regeneration: the equilibrium effect of calcium to strontium. *Journal of Materials Chemistry B* **6**, 2332–2339 (2018).
 243. Kokubo, T. *et al.* Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *Journal of Biomedical Materials Research* **24**, 721–734 (1990).
 244. Simon, P. *et al.* Cellulase immobilization on poly(methyl methacrylate) nanoparticles by miniemulsion polymerization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **35**, 649–658 (2018).
 245. Liu, Y. *et al.* Photografted poly(methyl methacrylate)-based high performance protein microarray for hepatitis B virus biomarker detection in human serum. *MedChemComm* **1**, 132–135 (2010).
 246. Lim, J. Y. *et al.* Systematic variation in osteoblast adhesion and phenotype with substratum surface characteristics. *Journal of Biomedical Materials Research* **68A**, 504–512 (2004).
 247. Steiner, G.; Zimmerer, C.; Salzer, R. Characterization of Metal-Supported Poly(methyl

- methacrylate) Microstructures by FTIR Imaging Spectroscopy. *Langmuir* **22**, 4125–4130 (2006).
248. Tommasini, F. J. *et al.* Poly (Methyl Methacrylate)-SiC Nanocomposites Prepared Through in Situ Polymerization. *Materials Research* **21**, 1-7 (2018).
249. Cavalu, S. *et al.* Bioactivity and antimicrobial properties of PMMA/Ag₂O acrylic bone cement collagen coated. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **6**, 779 - 790 (2011).
250. AQUINO, K. A. S. **Estabilização Radiolítica do Poli(metacrilato de metila) Industrial**. 2005. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.
251. Taherkhani, S., & Moztarzadeh, F. Influence of strontium on the structure and biological properties of sol–gel-derived mesoporous bioactive glass (MBG) powder. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **78**, 539–549 (2016).
252. Fredholm, Y. C. *et al.* Influence of strontium for calcium substitution in bioactive glasses on degradation, ion release and apatite formation. *J R Soc Interface* **9**, 880–889 (2012).
253. Lao, J., Jallot, E., & Nedelec, J.-M. Strontium-Delivering Glasses with Enhanced Bioactivity: A New Biomaterial for Antiosteoporotic Applications? *Chemistry of Materials* **20**, 4969–4973 (2008).
254. Xue, W. *et al.* Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **79A**, 804–814 (2006).
255. Von Euw, S. *et al.* Bone mineral: new insights into its chemical composition. *Sci Rep* **9**, 1-11 (2019).
256. Gu, X. *et al.* Degradation and biocompatibility of a series of strontium substituted hydroxyapatite coatings on magnesium alloys. *RSC Advances* **9**, 15013–15021 (2019).
257. Chung, C.-J., & Long, H.-Y. Systematic strontium substitution in hydroxyapatite coatings on titanium via micro-arc treatment and their osteoblast/osteoclast responses. *Acta Biomaterialia* **7**, 4081–4087 (2011).
258. Verberckmoes, S. C., De Broe, M. E., & D’Haese, P. C. Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. *Kidney International* **64**, 534–543 (2003).