

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

MARVIN DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DE BIOMINERALIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO
FUNCIONALIZADOS COM PEPTÍDEO DE LIGAÇÃO À HIDROXIAPATITA**

**RIO DE JANEIRO
2022**

MARVIN DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DE BIOMINERALIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO
FUNCIONALIZADOS COM PEPTÍDEO DE LIGAÇÃO À HIDROXIAPATITA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia,
como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre
em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientador(es): Marcelo Henrique Prado da Silva, D.C.
Aline Raybolt dos Santos Almeida, D.C

Rio de Janeiro

2022

©2022

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmar ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

do Nascimento, Marvin.

Avaliação de Biomineralização de Fosfatos de Cálcio Funcionalizados com Peptídeo de Ligação à Hidroxiapatita / Marvin do Nascimento. – Rio de Janeiro, 2022.

119 f.

Orientador(es): Marcelo Henrique Prado da Silva e Aline Raybolt dos Santos Almeida.

Dissertação (mestrado) – Instituto Militar de Engenharia, Ciência dos Materiais, 2022.

1. hidroxiapatita. 2. bioatividade. 3. peptídeo biomimético. 4. biomineralização. i. Prado da Silva, Marcelo Henrique (orient.) ii. dos Santos Almeida, Aline Raybolt (orient.) iii. Título

MARVIN DO NASCIMENTO

**Avaliação de Biomineralização de Fosfatos de Cálcio
Funcionalizados com Peptídeo de Ligação à Hidroxiapatita**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientador(es): Marcelo Henrique Prado da Silva e Aline Raybolt dos Santos Almeida.

Aprovada em 20 de dezembro de 2022, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva - D.C. do IME - Presidente



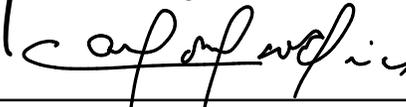
Prof.ª Aline Raybolt dos Santos Almeida - D.C. da UFRJ



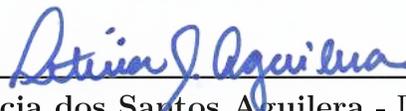
Prof.ª Amal Elzubair Eltom - D.C. do IME



Prof. Daniel Navarro da Rocha - D.C da R-Crio Celulas Tronco



Prof. Carlos Nelson Elias - D.C do IME



Prof.ª Letícia dos Santos Aguilera - D.C da UERJ

Rio de Janeiro

2022

Dedico esse trabalho a todas as coisas que deram errado até esse momento, pois, elas me fizeram aprender muito, e, provavelmente, sem elas, nada do que aconteceu teria dado certo e me feito chegar aqui.

AGRADECIMENTOS

Hoje, por ter adentrado no ciclo da pós graduação, consigo enxergar como a graduação é apenas mais um degrau. Isso não fica claro quando nos matriculamos e sonhamos com uma profissão. Acho que isso poderia até ser uma verdade antes, para os não millenials. Mas, hoje, o mundo é muito maior e cheio de possibilidades, e ter somente o ensino superior não é suficiente, a graduação se tornou apenas mais um degrau, assim como o ensino médio.

Cada passo à frente, consigo sentir uma deslimitação em todos os sentidos e possibilidades. Não que seja algo fácil embarcar em outra ciência além do qual se é formado, até porque, nunca me senti tão fora da minha área de conforto como antes. Estar aqui, nesse momento, é um privilégio enorme; ter chegado aqui, sem ter base alguma, é uma vitória.

Bom, gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à minha família; a minha madrinha Helena que foi a minha grande inspiração e alguém que eu sempre tive uma identificação muito forte; a minha mãe Marilene por todo o apoio desde o decorrer desse trajeto, por acreditar em mim em muitos momentos em que nem eu acreditei, e por me proporcionar o que ninguém mais poderia, me dar tempo; ao Rafael Magalhães por ser meu melhor amigo, por todo o companheirismo e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

As minhas amigas Tamara Tiradentes e Clara Rosalba por me abraçarem, me darem suporte em muitos momentos, me ajudarem a refletir sobre alguns projetos e ideias de vida e tornarem muitos dos meus dias mais leves e divertidos.

Aos meus colegas de pós graduação Maria Luiza e Taliana Serejo por dividir uma rotina de estudos durante as disciplinas; aos colegas do laboratório de biomateriais: Adriana Marcela, Ana Karine, Bruno Martins, Dyanni Manhães, Marcos Paulo e Roberto Monteiro pelos por serem sempre muito festivos e solícitos para ajudar a qualquer momento; a Suzana Noronha por me acolher e me ajudar quando eu comecei a trabalhar com hidroxiapatita; a Bianca Schottz e Naiara Le Sénéchal por serem amigas que eu encontrei durante essa jornada.

A equipe do laboratório de DRX Talita Gama, Julianna Garcia, Thaíssa Sampaio, e Jacqueline Cruz, da engenharia química, por serem super solícitas, pelas conversas e desabafos, e me ajudarem nas análises de DRX e FTIR.

As professoras que não me acompanharam, diretamente, dentro da instituição, mas que fazem parte da minha inspiração de ser quem eu estou me construindo: Aline Posch por sempre confiar no meu potencial, propor reflexões sobre novas perspectivas e proporcionar oportunidades únicas, pela orientação e fazer possível a minha voltar à

UFRJ como estagio docência; Andrea Tedesco por todo o carinho e me orientar desde a graduação e agora na especialização. Sempre me mostrando que temos que fazer tudo com muito amor, dedicação, e o “nosso” básico tem que ser muito alto; Ana Paula Colombo por ter me moldado quanto a senso crítico, nível de exigência, relevância, excelência e paixão pelo trabalho, por sempre insistir que a nossa pesquisa não é qualquer coisa e sempre pode ficar melhor, pois afinal “é nosso nome que está ali”. Por me mostrar o tamanho do seu nome, mesmo depois de eu ter saído de casa.

Ao apoio e parceria com a Mariah Hirata e Daniel Navarro pela rotina de laboratório, na R-Crio Células tronco, e por toda a ajuda para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Sergio Neves pelas excelentes aulas como uma fonte de inspiração a todo o momento, mostrando que o impossível pode ser feito; a professora Amal Eltom por toda paciência, companheirismo, disponibilidade durante a rotina de laboratório, por ter me recebido, carinhosamente, e sempre dispostas a ajudar e tirar dúvidas; a professora Andrea Machado por sempre estar solícita, pelo carinho e disponibilidade, e, também, por toda a ajuda oferecida. A minha coorientadora Aline Raybolt por ter me mostrado, desde a graduação, a possibilidade de ser transdisciplinar e construir saberes a partir desses conhecimentos, por acreditar nas possibilidades, pelos apoios e pelas conversas, por olhar nos olhos e ajudar durante o processo.

Ao meu orientador Marcelo Prado por me acolher quando eu precisava, pela atenciosidade, pela amizade, por sempre estar envolvido com a docência e inovação, por ter aceitado me orientar nesse projeto, por dedicar um tempo especial para responder, e orientar, mesmo que fora do expediente, por solucionar o insolucionável, por ter me ajudado durante toda essa pesquisa e por acreditar que sou relevante.

E por último, a mim, por ter me colocado fora da área de conforto a ponto de ter aceitado esse desafio, por nunca desistir de nada, por agarrar cada oportunidade como se fosse a última e por investir no que eu acredito.

*"Ele traz o sol nos olhos e o mar no sorriso.
Ele traz a maré alta, ressaca de alegria e luz,
que nos inunda, nos afoga, nos sacia.
Ele traz o sol nos olhos e cada olhar que lança
é como um amanhecer de verão.
Céu azul, ar fresco, maresia é estar ao seu lado.
Ele traz o sol nos olhos e os usa pra falar.
Falar alto, falar claro e sem dizer uma palavra diz tudo.
Ele carrega alegria, leveza, frescor.
Ele carrega um pouco de cada pessoa que quer um pouco dele.
Ele carrega a vida como se fosse uma pena e tem
pena de quem carrega a vida pesada demais.
Ele olha o amor nos olhos e o vê como um circo,
o amor olha ele nos olhos e o vê como um espetáculo.
Olhos de sol, olhos de luz, olhos de Marvin".*

Tamara Tiradentes

RESUMO

Biomateriais cerâmicos, como a hidroxiapatita e os fosfatos de cálcio, se assemelham aos constituintes inorgânicos do tecido ósseo, cartilaginoso e do complexo amelodentinário. Sendo assim, a fim de se conseguir uma regeneração tecidual, uma estratégia que se mostra promissora é a funcionalização desses fosfatos de cálcio com peptídeos biomiméticos para o aumento de bioatividade a nível de condução. Nesse trabalho utilizaram-se pastilhas bifásicas de hidroxiapatita e fosfato tricálcico com o intuito de mimetizar os tecidos amelodentinários. Assim, o objetivo foi avaliar a biomineralização dos fosfatos de cálcio com ligação de peptídeos à hidroxiapatita, *in vitro*. As pastilhas foram sintetizada por precipitação aquosa, prensada em pastilhas, e sinterizada a 1000°C por 1h. Uma pequena quantidade (50µl) do peptídeo foi depositada na superfície das pastilhas e depois foram realizados os testes de bioatividade em solução de McCoy e de citotoxicidade (indireta), o material foi caracterizado por difração de raios X, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo. Os resultados mostraram que a funcionalização com o peptídeo biomimético se mostrou mais eficaz para promover precipitações de apatita semelhante a apatita óssea (*bone like apatite*) em pastilhas de fosfato de cálcio, isso quando comparado com os grupos controle (dois grupos controles positivos e um grupo controle negativo).

Palavras-chave: hidroxiapatita. bioatividade. peptídeo biomimético. biomineralização.

ABSTRACT

Ceramic biomaterials, such as hydroxyapatite and calcium phosphates, resemble the inorganic constituents of bone tissue, cartilage and amelodental complex. Thus, in order to achieve tissue regeneration, a promising strategy is the functionalization of these calcium phosphates with biomimetic peptides to increase bioactivity at the conduction level. In this work biphasic pellets of hydroxyapatite and tricalcium phosphate were used as representatives of amelodentary tissues. Thus, the objective was to evaluate the biomineralization potential of calcium phosphates with peptide binding to hydroxyapatite, *in vitro*. Hydroxyapatite was synthesized by aqueous precipitation, pressed into pellets, and sintered at 1000°C for 1h. A small amount (50 μ l) of the peptide was deposited on the surface of the pellets and then the bioactivity tests in McCoy's solution and cytotoxicity (indirect) were performed. The material was characterized by X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy with field emission source. The results showed that functionalization with the biomimetic peptide was more effective in promoting precipitations of bone-like apatite in calcium phosphate pellets compared to the control groups (two positive control groups and one negative control group).

Keywords: hydroxyapatite. bioactivity. biomimetic peptide. biomineralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura Anatômica do Dente. A estrutura de um dente posterior em vista anatômica com sessão de corte sagital (GARTNER, 2018).	24
Figura 2 – Esquema da Estrutura dos Prismas de Esmalte. Elaborado pelo autor. Adaptado de (WOJCIECH; PAWLINA, 2021).	25
Figura 3 – Cortes Histológicos do Esmalte. Adaptado de (BALOGH; FEHRENBACH, 2012).	26
Figura 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura do Esmalte Dentário. Adaptado de (KATCHBURIAN, 2017).	27
Figura 5 – Superfície de Esmalte e Dentina na Junção Amelodentinária. Adaptado de (BALOGH; FEHRENBACH, 2012; KATCHBURIAN, 2017).	27
Figura 6 – Esquema da Estrutura dos Cristais de Dentina. Elaborado pelo autor. Adaptado de (WOJCIECH; PAWLINA, 2021).	28
Figura 7 – Cortes Histológicos da Dentina. Adaptado de (NANCI, 2008; BALOGH; FEHRENBACH, 2012).	29
Figura 8 – Microscopia Eletrônica de Varredura da Dentina (IVANCIK et al., 2012).	29
Figura 9 – Esquema e Micrografia da Interralação de Formação de Esmalte e Dentina. Coloração HE com aumento de 240x (WOJCIECH; PAWLINA, 2021).	30
Figura 10 – Estrutura Cristalográfica da Hidroxiapatita. Adaptado de (LACRUZ et al., 2017).	32
Figura 11 – Comparação dos Modelos <i>Amelogenin-Guide</i> . Adaptado de (YANG et al., 2010).	34
Figura 12 – Modelo de Biomineralização Proteína-Mineral em Esmalte. Adaptado de (MORADIAN-OLDAK; GEORGE, 2021).	35
Figura 13 – Estrutura Molecular do Colágeno Fibrilar. Imagem mostrando a estrutura molecular de colágeno fibrilar com a organização de fibras, fibrilas, tripla hélice, α -hélice e aminoácidos. Adaptado. (autor desconhecido) .	36
Figura 14 – Mecanismo de Formação da Dentina. Adaptado de (ZHONG et al., 2013).	37
Figura 15 – Modelo de Biomineralização Proteína-Mineral em Dentina. Adaptado de (MORADIAN-OLDAK; GEORGE, 2021).	38
Figura 16 – Indentação de Dureza Vickers no Complexo Amelodentinário. Adaptado de (ROY; BASU, 2008).	39
Figura 17 – Nanoindentação de Bastões de Esmalte. Adaptado de (JENG et al., 2011).	40
Figura 18 – Densidade e Dureza Knoop do Esmalte. Adaptado de (HE; HAO, 2010).	40
Figura 19 – Nanoindentação da Dentina. Adaptado de (ZISKIND et al., 2013).	41

Figura 20 – Diagrama de Estabilidade do Sistema $Ca - P - H_2O$ da Hidroxiapatita a 37°C. Elaborado pelo autor. Adaptado de (BASTOS et al., 2001). . .	44
Figura 21 – Diagrama de Fases do Sistema Ca-P. Elaborado pelo autor. Adaptado de (HENCH, 2001).	45
Figura 22 – Espectroscopia Infravermelha de Transformada de Fourier de Pastilhas de Hidroxiapatita (RIBEIRO et al., 2021).	46
Figura 23 – Difratoograma das Pastilhas de Fosfato de Cálcio Verde e Sinterizado. .	62
Figura 24 – Plotagem da Equação de Scherrer Modificada para Pastilhas de Fosfato de Cálcio Verde e Sinterizada.	63
Figura 25 – Espectroscopia de Infravermelho de Transformada de Fourier da pastilha de Fosfato de Cálcio	64
Figura 26 – Morfologia da Pastilha de Fosfato de Cálcio Sinterizada. Fotomicrografia de MEV-FEG	65
Figura 27 – Morfologia das Pastilhas de Alumina submetidas ao teste de Bioatividade. (a) 24h - 10.000x, (b) 48h - 10.000x, (c) 72h - 10.000x, (d) 168h - 10.000x.	67
Figura 28 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 2h - 10.000x, (b) 3h - 10.000x, (c) 4h - 10.000x, (d) 5h - 10.000x.	68
Figura 29 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 6h - 1.000x, (b) 6h - 5.000x, (c) 6h - 10.000x	69
Figura 30 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 12h - 1.000x, (b) 12h - 5.000x. (c) 126h - 10.000x	70
Figura 31 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 24h - 10.000x, (b) 48h - 10.000x.	71
Figura 32 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 72h - 1.000x, (b) 72h - 5.000x, (c) 72h - 10.000x, (d) 72h - 20.000x.	73
Figura 33 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 168h - 10.000x, (b) 336h - 10.000x.	74
Figura 34 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 168h - 1.000x, (b) 168h - 5.000x, (c) 168h - 5.000x, (d) 168h - 4.999x, (e) 168h - 10.000x.	76

Figura 35 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 2h - 10.000x, (b) 3h - 10.000x.	77
Figura 36 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 4h - 1.000x, (b) 4h - 5.000x, (c) 4h - 10.000x.	78
Figura 37 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 5h - 5.000x, (b) 5h - 10.000x.	79
Figura 38 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 6h - 10.000x, (b) 12h - 10.000x.	79
Figura 39 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade grupo Peptídeo. (a) 24h - 10.000x, (b) 48h - 10.000x.	80
Figura 40 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade grupo Peptídeo. (a) 72h - 10.000x, (b) 168h - 10.000x.	80
Figura 41 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade grupo Peptídeo. (a) 336h - 10.000x, (b) 336h - 20.000x.	82
Figura 42 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade grupo Peptídeo. (a) 168h - 115x, (b) 168h - 1.000x, (c) 168h - 2.500x, (d) 168h - 2.500x, (e) 168h - 5.000x.	84
Figura 43 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio PBS. (a) 2h - 20.000x.	85
Figura 44 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio PBS. (a) 3h - 5.000x, (b) 3h - 10.000x, (c) 4h - 5.000x, (d) 4h - 10.000x.	86
Figura 45 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio PBS. (a) 5h - 5.000x, (b) 5h - 10.000x, (c) 6h - 5.000x, (d) 6h - 10.000x, (e) 6h - 20.000x.	88
Figura 46 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio PBS. (a) 12h - 5.000x, (b) 12h - 10.000x.	89
Figura 47 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio PBS. (a) 24h - 10.000x, (b) 48h - 10.000x, (c) 72h - 10.000x, (d) 168h - 10.000x, (e) 336h - 10.000x.	91

Figura 48 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 5h - 1.000x, (b) 6h - 1.000x.	92
Figura 49 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 24h - 1.000x, (b) 24h - 1.000x, (c) 24h - 5.000x, (d) 24h - 10.000x.	93
Figura 50 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 24h - 1.000x, (b) 24h - 5.000x, (c) 72h - 1.000x, (d) 72h - 5.000x, (e) 24h - 10.000x, (f) 72h - 10.000x, (g) 24h - 20.000x, (h) 24h - 30.000x, (i) 72h - 20.000x, (j) 72h - 30.000x.	96
Figura 51 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP do grupo Peptídeo. (a) 336h - 1.000x, (b) 336h - 1.000x.	97
Figura 52 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 336h - 5.000x, (b) 336h - 10.000x, (c) 336h - 20.000x.	98
Figura 53 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 336h - 5.000x, (b) 336h - 10.000x, (c) 336h - 20.000x, (d) 336h - 20.000x.	99
Figura 54 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP no meio PBS. (a) 3h - 1.000x, (b) 4h - 1.000x, (c) 5h - 1.000x, (d) 6h - 1.000x, (e) 24h - 1.000x, (f) 24h - 5.000x, (g) 24h - 20.000x.	102
Figura 55 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP no meio PBS. (a) 336h - 1.000x, (b) 336h - 5.000x, (c) 336h - 10.000x.	104
Figura 56 – Difratoograma das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao Teste de Bioatividade.	106
Figura 57 – Espectroscopia de Infravermelho de Transformada de Fourier dos Grupos do Teste de Bioatividade.	107
Figura 58 – Espectroscopia de Infravermelho de Transformada de Fourier dos Grupos do Teste de Bioatividade.	108
Figura 59 – Teste de Viabilidade em Células Tronco Mesenquimais da Polpa Dentária.	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos Constituintes Amelodentinários	31
Tabela 2 – Atividades Biológicas dos Biomateriais	42
Tabela 3 – Fases de Fosfato de Cálcio de acordo com a Razão Molar	43
Tabela 4 – Solubilidade dos Fosfatos de Cálcios	44
Tabela 5 – Frequências de Absorção de Espectro Infravermelho dos Fosfatos de Cálcio	46
Tabela 6 – Obtenção de Hidroxiapatita via Precipitação Aquosa	47
Tabela 7 – Carga Axial utilizada para Prensagem	56
Tabela 8 – Propriedades do Peptídeo de Ligação à Hidroxiapatita	56
Tabela 9 – Solução do Peptídeo de Ligação à Hidroxiapatita	57
Tabela 10 – Equação de Scherrer	57
Tabela 11 – Composição do Meio de Cultura de McCoy	58
Tabela 12 – Grupos Estabelecidos para o Teste de Bioatividade	59
Tabela 13 – Teste de Bioatividade em Meio McCoy	66
Tabela 14 – Resultados da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

σ	Tensão em MPa
<i>bone like apatite</i>	Apatita Semelhante à Osso
A	Área em milímetros (mm)
a	Gravidade
ACP	<i>Amorphous Calcium Phosphate</i> (Fosfato de Cálcio Amorfo)
OA	Oxiapatita
Asp	Ácido Aspártico
BSP	<i>ABone Sialoprotein</i> (Sialoproteína Óssea)
CaP	<i>ACalcium Phosphate</i> (Fosfato de Cálcio)
CDHA	<i>ACalcium Deficient Hydroxyapatite</i> (Hidroxiapatita Cálcio Deficiente)
CHA tipo A	Hidroxiapatita Carbonatada do Tipo A
CHA tipo B	Hidroxiapatita Carbonatada do Tipo B
d	Densidade em kg/L ou g/L
DCPA	<i>Dicalcium Phosphate Anhydrous</i> (Fosfato Dicálcico Anhidro)
DCPD	<i>Dicalcium Phosphate Monohydrate</i> (Fosfato Dicálcico Monohidratado)
DGP	<i>ADentin Glycoprotein</i> (Glicoproteína Dentinária)
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMP	<i>ADentin Matrix Protein</i> (Proteína da Matriz Dentinária)
DPP	<i>Dentin Phosphoprotein</i> (Fosfoproteína Dentinária)
DRX	Difração de Raio X
DSP	<i>Dentin Sialoprotein</i> (Sialoproteína Dentinária)
DSPP	<i>Dentin Sialophosphoprotein</i> (Sialofosfoproteína Dentinária)
F	Força em Newton
FA	Fluorapatita

FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier)
HA	Hidroxiapatita
HBP	<i>Hydroxyapatite Binding Peptide</i> (Peptídeo de Ligação a Hidroxiapatita)
JAD	Junção Amelodentinária
KHN	Dureza Knoop
KLK4	<i>Kallikrein Related Peptidase 4</i> (Peptidase 4)
MCPA	<i>Anhydrous Monocalcium Phosphate</i> (Fosfato Monocálcico Anhidro)
MCPM	<i>Monocalcium Phosphate Monohydrate</i> (Fosfato Monocálcico Monohidratado)
MEPE	<i>Phosphoglycoprotein from Extracellular Matrix</i> (Fosfoglicoproteína da Matriz Extracelular)
MEV-FEG	<i>Scanning Electron Microscopy - Field Emission Gun</i> (Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo)
MM	Massa Molar em g/mol
MMP-20	Matriz Metaloproteinase-20
NCP	<i>Non Collagenous Proteins</i> (Proteínas Não Colagenosas)
OC	Osteocalcina
OCP	<i>Octacalcium Phosphate</i> (Fosfato Octacálcico)
ON	Osteonectina
OPN	Osteopontina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
PILP	Precusores Líquidos Induzidos por Polímero
Pse	<i>Phosphoserines</i> (Fosfoserinas)
Q	Carga em kgf
Q_M	Quantidade do Material
Q_{Mol}	Quantidade do Material em Mol

r	Raio
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i> (Fluido Corporal Simulado)
SIBLING	<i>Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein</i>
TCP	<i>Tricalcium Phosphate</i> (Fosfato Tricálcico)
TTCP	<i>Tetracalcium Phosphate</i> (Fosfato Tetracálcico)

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{+2}	Íon cálcio
PO_4^{-3}	Íon Fosfato
Mg^{+2}	Íon Magnésio
Na^{+2}	Íon Sódio
F^{-}	Íon Fluoreto
K^{+}	Íon Potássio
CO_3^{-2}	Íon Carbonáto
$C_6H_5O_7^{-3}$	Íon Citrato
Cl^{-}	Íon Cloreto
OH^{-}	Íon Hidroxila
$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	Hidroxiapatita
$Ca_{10}(PO_4)_6F$	Fluorapatita
NH_4OH	Hidróxido de Amônio
KOH	Hidróxido de Potássio
$NaOH$	Hidróxido de Sódio
$(NH_4)_2HPO_4$	Fosfato de Amônio Dibásico
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
$Ca(OH)_2$	Hidróxido de Cálcio
$C_3H_6O_3$	Ácido Láctico
H_3PO_4	Ácido Fosfórico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVO	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	A HISTOLOGIA DO COMPLEXO AMELODENTINÁRIO	24
3.2	A COMPOSIÇÃO DO ESMALTE E DENTINA EM ARRANJO MOLECULAR-CRISTALOGRAFICO	31
3.3	PROPRIEDADES MECÂNICAS DO COMPLEXO AMELODENTINÁRIO	38
3.4	APATITAS E ROTAS DE SÍNTESE POR VIA ÚMIDA	42
3.5	FUNCIONALIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO COM PEPTÍDEOS BIOMIMÉTICOS	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	DESCRIÇÃO GERAL	55
4.2	SÍNTESE DE PASTILHAS DE FOSFATO DE CÁLCIO	55
4.3	PEPTÍDEO DE LIGAÇÃO A HIDROXIAPATITA	56
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS	57
4.4.1	DIFRAÇÃO DE RAIOS X	57
4.4.2	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER	57
4.4.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM FONTE DE EMISSÃO DE CAMPO	58
4.5	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DAS AMOSTRAS	58
4.5.1	TESTE DE BIOATIVIDADE EM MEIO DE CULTURA MCCOY	58
4.5.2	TESTE DE CITOTOXICIDADE INDIRETA	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	DESCRIÇÃO GERAL	61
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS PASTILHAS DE FOSFATO DE CÁLCIO	61
5.3	TESTE DE BIOATIVIDADE EM MEIO DE CULTURA MCCOY	65
5.3.1	PADRÃO DE PRECIPITAÇÃO	91

5.3.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS PASTILHAS BIFÁSICAS DE HIDROXIAPATITA E FOSFATO TRICÁLCICO SUBMETIDAS AO TESTE DE BIOATIVIDADE	105
5.4	TESTE DE CITOTOXICIDADE INDIRETA	109
6	CONCLUSÃO	111
7	LIMITAÇÕES E SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS	112
	REFERÊNCIAS	113

1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais são dispositivos aloplásticos, que podem ser de origem sintética ou natural, e permitem uma interação, de caráter restaurador-reabilitante, a nível fisiológico e bioquímico com organismo vivo em condições de biocompatibilidade. Isso condiz com a permeabilidade do biomaterial permitir a execução de função sem ocasionar efeito de corpo estranho (NASCIMENTO, 2022). Nesse sentido, dentro da classe de biomateriais, se destacam, principalmente, as biocerâmicas quando direcionadas para regeneração e reparo de tecidos orgânicos mineralizados (RIBEIRO et al., 2021).

Uma das características fundamentais das biocerâmicas é o potencial de bioatividade permitindo uma interação bioquímica com os tecidos (ROCHA et al., 2017). Isso condiz com atividades de gênese (interação do biomaterial com as células), indução (interação do biomaterial com as células tronco mesenquimais) e condução (interação do biomaterial com o tecido já existente) (LEGEROS, 2008; SINHORETI; VITTI; SOBRINHO, 2013).

A Hidroxiapatita (HA) e os fosfatos de cálcio (CaP) são classificados como biomateriais cerâmicos que se assemelham aos constituintes inorgânicos do tecido ósseo, cartilagenoso e do complexo amelodentinário (esmalte e dentina) (MOURA et al., 2012). Além disso, essas biocerâmicas satisfazem o requisito de biocompatibilidade não provocando resposta inflamatória e/ou imunitária. Isso além de promoverem bioatividade cristalinidade-dependente (FONSECA et al., 2009). Esses materiais podem ser designados como biomateriais de terceira geração da engenharia de tecidos, no qual possuem a tecnologia de sistemas de regeneração tecidual por meio da biologia molecular e ciências dos materiais (ZAVAGLIA; SILVA, 2016).

Além disso, embora a HA possua biocompatibilidade (capacidade de promover ligação bioquímica com o tecido) e boa condutividade (habilidade de conduzir a neoformação tecidual), ainda assim tem um baixo potencial de estímulo de crescimento tecidual (DOROZHKIN, 2007). Dessa forma, a incorporação de outros elementos associados à síntese de HA estabelece uma forma mais dinâmica e semelhante com a formação tecidual *in natura*. Isso a fim de biomimetizar as apatitas orgânicas e alcançando um maior potencial de bioatividade (DOROZHKIN, 2009; DOROZHKIN, 2011)

Uma dessas estratégias consiste na utilização de peptídeos biomiméticos para a funcionalização dos CaP, e assim, um aumento de bioatividade, principalmente, a nível de condução, e, sendo assim, o aumento do número de precipitados a nível tecidual para promover biomineralização (ZHU et al., 2016). Sendo assim, idealizando uma ligação específica com HA, utilizaram-se Peptídeos de Ligação à Hidroxiapatita (HBP) que biomimetizam a função das proteínas da matriz orgânica dos tecidos amelodentinários

(GUNGORMUS et al., 2008).

Nesse sentido, esse trabalho se justifica com o uso do peptídeo HBP funcionalizando pastilhas de CaP para aumentar a bioatividade (*in vitro*) de biomateriais a base de CaP para aplicações biomédicas, testando-os em meio McCoy. Isso de modo a conseguir propor um aumento de atividade biológica (bioatividade) à nível de condução. E assim, em um menor período de tempo, para uma possível aplicabilidade, a posteriori, (*in vivo*) de biomateriais a base de CaP funcionalizados que promovem a biomineralização do complexo amelodentinário.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a biomineralização de fosfatos de cálcio com peptídeo de ligação à hidroxiapatita.

2.2 Objetivos Específicos

- Biomimetizar a neoformação de *bone like apatite* em pastilhas de CaP, simulando os tecidos dentários, sem usar célula viva;
- Avaliar a bioatividade das pastilhas de CaP com e sem peptídeo em meio de cultura McCoy;
- Avaliar a citotoxicidade indireta de pastilhas de CaP com e sem peptídeo;
- Caracterizar morfologia das amostras com o Microscópio Eletrônico de Varredura, e estrutura por Difração de Raio X e por Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Histologia do Complexo Amelodentinário

O dente é um órgão formado por um tecido epitelial diferenciado e tipos de tecidos conjuntivo especializados e estruturado em três camadas de tecidos duros e uma de tecido mole, respectivamente, esmalte, dentina, cemento e polpa (KIERSZENBAUM, 2016). O envolto do dente é composto por um tecido ligamentar formado, principalmente, por fibras colagenosas do tipo III (fibras de *Sharpey*), o ligamento periodontal. Esse ligamento tem como função a nutrição, o suporte e sustentação de forças mecânicas, isso além de fazer a interseção entre dente, tecido ósseo (osso alveolar) e gengiva (Figura 1) (NANCI, 2008). As camadas de tecido duro do dente possuem sua composição correspondente ao seu peso.

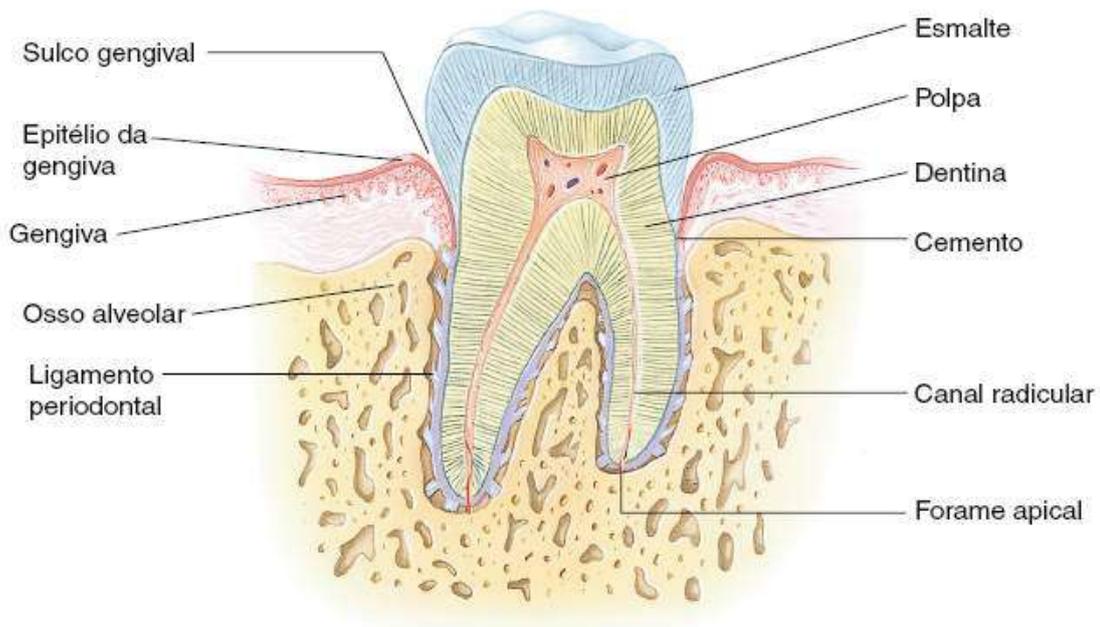


Figura 1 – Estrutura Anatômica do Dente. A estrutura de um dente posterior em vista anatômica com sessão de corte sagital (GARTNER, 2018).

O esmalte, originado pelo ectoderma, é um tecido, majoritariamente, inorgânico mais superficial da estrutura dentária e recobre totalmente a coroa dental; a dentina, derivada da crista neural, é um tecido híbrido com porções orgânicas e inorgânicas, sendo mais abundante e compõe, completamente, a estrutura dental; o cemento, com origem no mesênquima, possui um menor grau de mineralização revestindo a superfície da raiz do dente. Todos esses tecidos possuem composições parecidas, porém com especificidades e

arranjos que vão determinar as características de suas propriedades (KIERSZENBAUM, 2016).

O complexo amelodentinário se estrutura, histologicamente, em esmalte, dentina e junção amelodentinária, que é a interseção entre o esmalte e a dentina (KIERSZENBAUM, 2016). O esmalte é o tecido mineral mais duro do corpo e é secretado por ameloblastos que são células que só existem, exclusivamente, no período de formação dos dentes. Portanto, trata-se de um tecido acelular (LACRUZ et al., 2017). Esse tecido possui uma conformação prismática em sentido vertical organizando uma sequência de prismas de esmalte ondulados e regiões interprismáticas (regiões semelhantes aos prismas de esmalte, mas em orientação diferente) (Figura 2). Cada prisma de esmalte é arranjado por cristais de hidroxiapatita em fator de empacotamento máximo e possuem uma camada de revestimento orgânico (bainha do prisma) (PANDYA; DIEKWISCH, 2019).

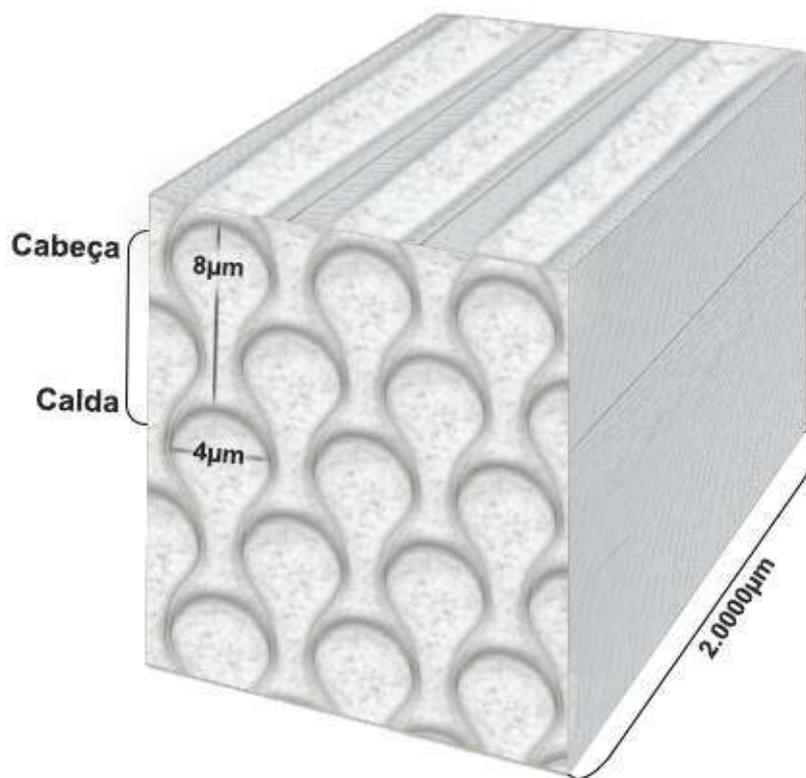


Figura 2 – Esquema da Estrutura dos Prismas de Esmalte. Elaborado pelo autor. Adaptado de (WOJCIECH; PAWLINA, 2021).

Os prismas de esmalte, ou bastões de esmalte, são descritos como “buraco de fechadura” e se estendem da junção amelodentinária até a superfície do esmalte. Na Figura 2 é possível observar o corte transversal desses prismas com a parte superior abaulada denominado cabeça, enquanto a parte inferior do bastão é denominada cauda. Além disso, dentro da cabeça, a maior parte dos cristais de esmalte está orientada, paralelamente, ao longo eixo de cada prisma. Dentro da cauda, os cristais são orientados mais obliquamente

(WOJCIECH; PAWLINA, 2021).

Cabe ressaltar que não existe diferença estrutural entre os prismas de esmalte e as regiões interprismáticas, ambos têm a mesma composição e o mesmo fator de empacotamento, o que diferencia essas estruturas é a ordem do direcionamento desses prismas. A orientação dos prismas segue o longo eixo do dente, em sentido longitudinal, mas ao se aproximar das periferias, as direções assumem uma inclinação, diretamente, proporcional ao limite da camada prismática (Figuras 3 e 4) (KATCHBURIAN, 2017).

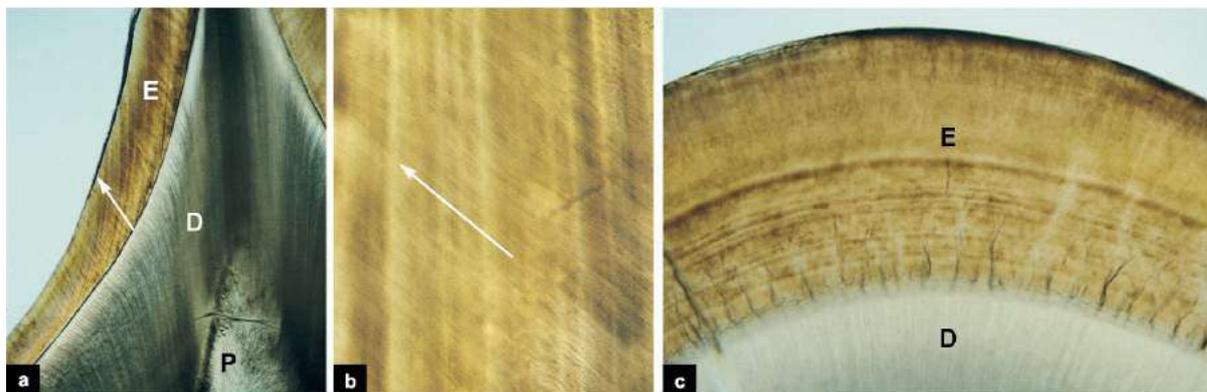


Figura 3 – Cortes Histológicos do Esmalte. Adaptado de (BALOGH; FEHRENBACH, 2012).

Na Figura 3 pode ser observado o aspecto microscópico das linhas de Retzius atravessando os prismas do esmalte (E); (a) Seção longitudinal dos prismas (seta) recobrindo a dentina (D) e a polpa (P) na região da coroa; (b) Em maior aumento, seção longitudinal dos prismas (seta) com as linhas de Retzius; (c) Seção transversal dos prismas recobrindo a dentina (D), com as linhas de Retzius assemelhando-se aos anéis de crescimento das árvores.

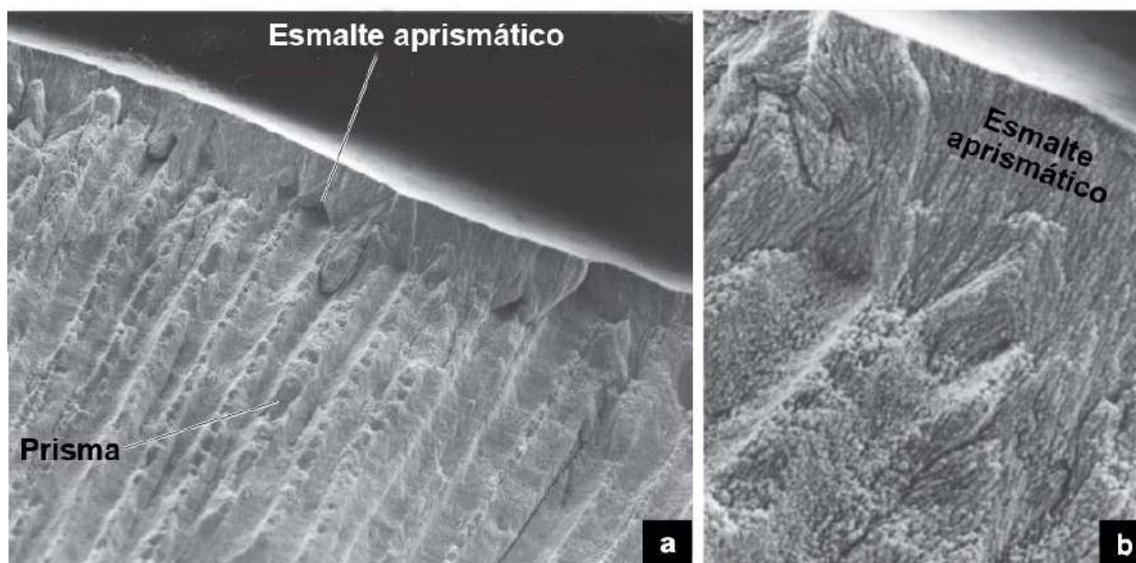


Figura 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura do Esmalte Dentário. Adaptado de (KATCHBURIAN, 2017).

Enquanto, na Figura 4, é possível observar a visão tridimensional de esmalte mineralizado mostrando os prismas de esmalte e regiões aprismáticas em (a) e (b). Além disso, o esmalte possui uma espessura média máxima de 2,5mm e tem como propriedade uma alta dureza, porém é um tecido, altamente, friável. A estrutura cristalina hexagonal possui, aproximadamente, de 20 a 60nm de largura e 30 a 90nm de altura, e existe uma distância de, aproximadamente 4 μ m, entre as regiões prismáticas e interprismáticas (PANDYA; DIEKWISCH, 2019). Além disso, a migração do esmalte para a dentina é mediada pela junção amelodentinária. Essa região que possui uma espessura de aproximadamente 10 a 12 μ m (Figura 5) (KATCHBURIAN, 2017).

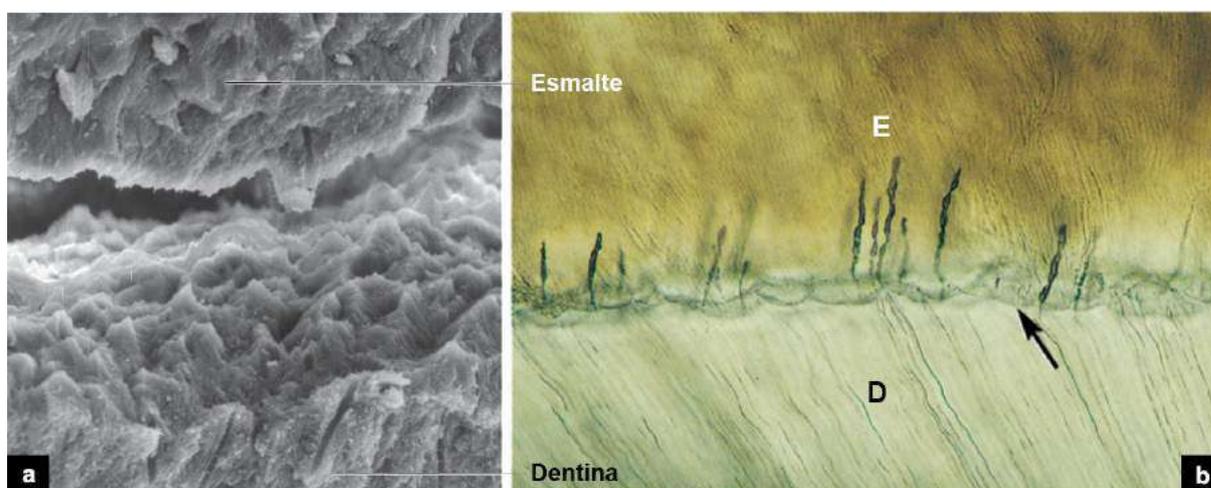


Figura 5 – Superfície de Esmalte e Dentina na Junção Amelodentinária. Adaptado de (BALOGH; FEHRENBACH, 2012; KATCHBURIAN, 2017).

A Figura 5 mostra em (a) a microscopia eletrônica de varredura entre esmalte e dentina (interface) mostrando as diferenças topográficas de interseção de um tecido para o outro; (b) o aspecto microscópico da junção amelodentinária (seta) exibindo a interface com o lado côncavo voltado para o esmalte (E) e o convexo para a dentina (D).

A dentina é o tecido mais abundante do dente, possui um íntimo contato, desde a sua formação, com a polpa que é um tecido conjuntivo não mineralizado, altamente, vascularizado e com presença de plexos nervosos. Esse tecido possui uma dureza menor que a do esmalte, porém maior que a do tecido ósseo. Além disso, a dentina possui grande resiliência o que satisfaz um comportamento elástico e impede o esmalte de fraturar (KIERSZENBAUM, 2016). A organização dos cristais de dentina pode ser dividida em túbulos dentinários, dentina peritubular e dentina intertubular (Figura 6).

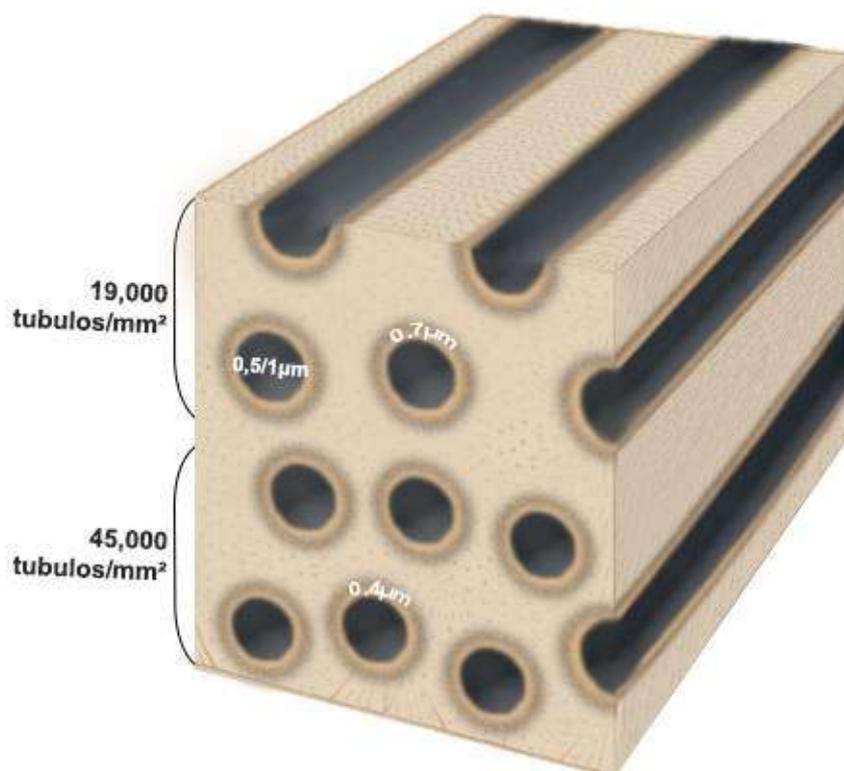


Figura 6 – Esquema da Estrutura dos Cristais de Dentina. Elaborado pelo autor. Adaptado de (WOJCIECH; PAWLINA, 2021).

Assim, os túbulos dentinários são estruturas não retilíneas, em sentido tangencial/transversal, que são permeados por fluido dentinário. Esses túbulos possuem, aproximadamente, 0,5 a 1 µm de diâmetro de lúmen, enquanto próximo da junção amelodentinária uma densidade de túbulos diferente da observada na região mais próxima da polpa, respectivamente, 19.000 e 45.000 túbulos/mm². Enquanto a dentina peritubular é um tecido hipermineralizado com espessura, aproximadamente, de 0,7 µm perto de região amelodentinária e 0,4 µm perto da polpa. Já a dentina intertubular é o tecido que se situa entre um

túbulo dentinário e outro (Figuras 7 e 8) (KATCHBURIAN, 2017).

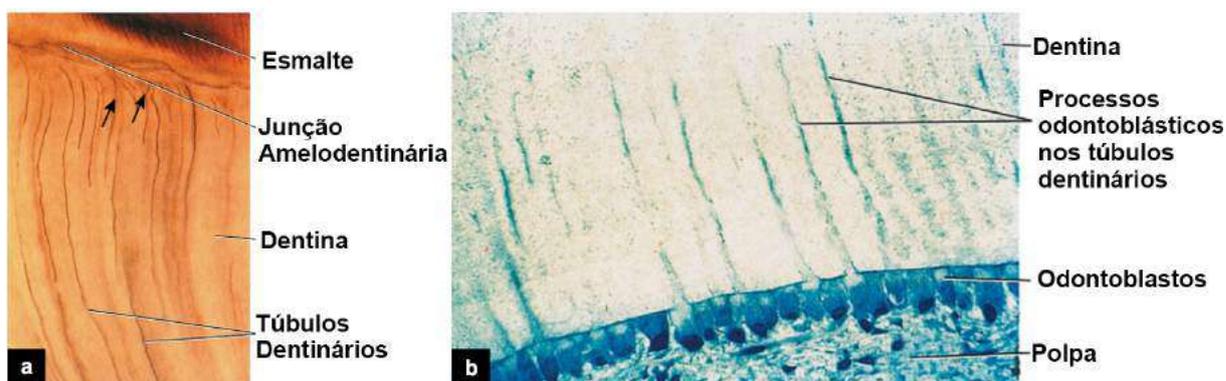


Figura 7 – Cortes Histológicas da Dentina. Adaptado de (NANCI, 2008; BALOGH; FEHRENBACH, 2012).

Na Figura 7, pode ser observado em (a) o aspecto microscópico dos componentes dos túbulos dentinários, os quais contêm os processos odontoblásticos (setas) e o fluido dentinário; e em (b) os túbulos dentinários (na parte superior da imagem), com os processos odontoblásticos penetrando em seu interior a partir da polpa, que contém uma camada de corpos de odontoblastos aos quais permanecem conectados os processos odontoblásticos.

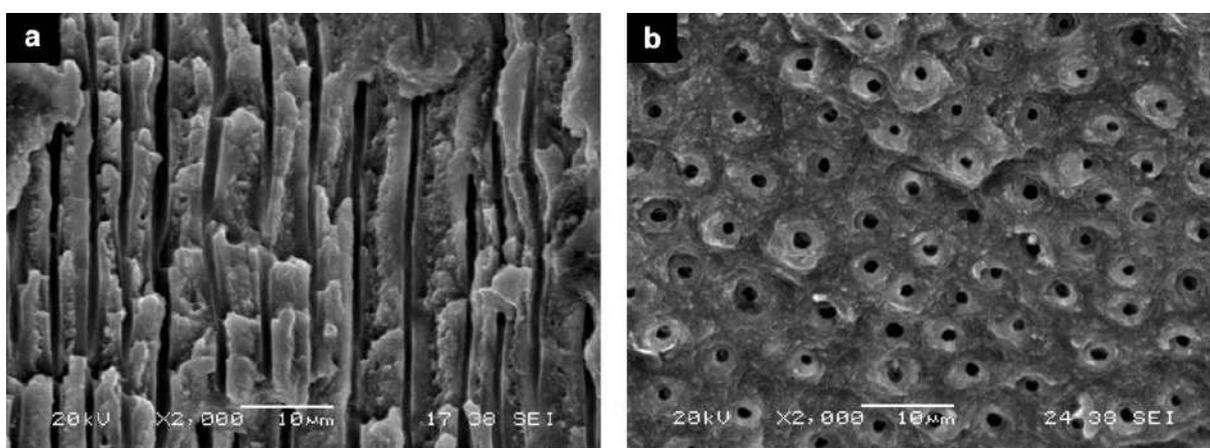


Figura 8 – Microscopia Eletrônica de Varredura da Dentina (IVANCIK et al., 2012).

Enquanto na Figura 8, as micrografias eletrônicas de varredura é identificado superfícies de dentina fraturada com crescimento de trincas por fadiga; (a) orientação a 0° com amostras de dentina; (b) orientação de 90° com amostras de dentina.

O processo de odontogênese para o complexo amelodentinário pode ser classificado em amelogênese e dentinogênese. Durante a amelogênese, os ameloblastos secretam o esmalte em sentido via intercelular formando uma camada de mineralização contínua (LACRUZ et al., 2017). Assim, em um primeiro momento, forma-se uma camada pseu-

dohomogênea alinhada com a camada dentinária em processo de formação, ou seja, uma camada aprismática. Em seguida, ocorre a deposição incremental seguindo o processo de Tomes (curta projeção cônica que comanda a direção e sentido da formação do esmalte) formando os prismas de esmaltes, ou seja, uma camada prismática. Ao final de toda a deposição, o ameloblasto sofre o processo de autofagia (NANCI, 2008).

No processo de dentinogênese, os odontoblastos formam, em sentido centrípeto, a pré dentina não mineralizada para então tardiamente ocorrer o processo de mineralização. Isso se identifica como a secreção de fibras colagenosas híbridas de colágeno tipo I e, posteriormente, a biomineralização através da deposição dos cristais de apatita (por meio de íons de fosfato de cálcio vesicular). Sendo assim, a pré dentina é a porção adjacente a polpa, e é idealizada como uma zona de formação e maturação de matriz orgânica dentinária (WOJCIECH; PAWLINA, 2021). Além disso, as proteínas não colagenosas guiam em uma relação quantidade-dependente de colágeno – *collagen guide* – o processo de mineralização da pré dentina, isso uma vez que a família de proteínas SIBLING possui sinalização autócrina e é responsável por regular e estabilizar a formação de dentina (NANCI, 2008). Essa mineralização se inicia de modo vesicular, vai progredindo para glóbulos de mineralização a até cada glóbulo encontrar um ao outro e existir um espaço mineralizado globular e espaços de dentina interglobular (Figura 9)

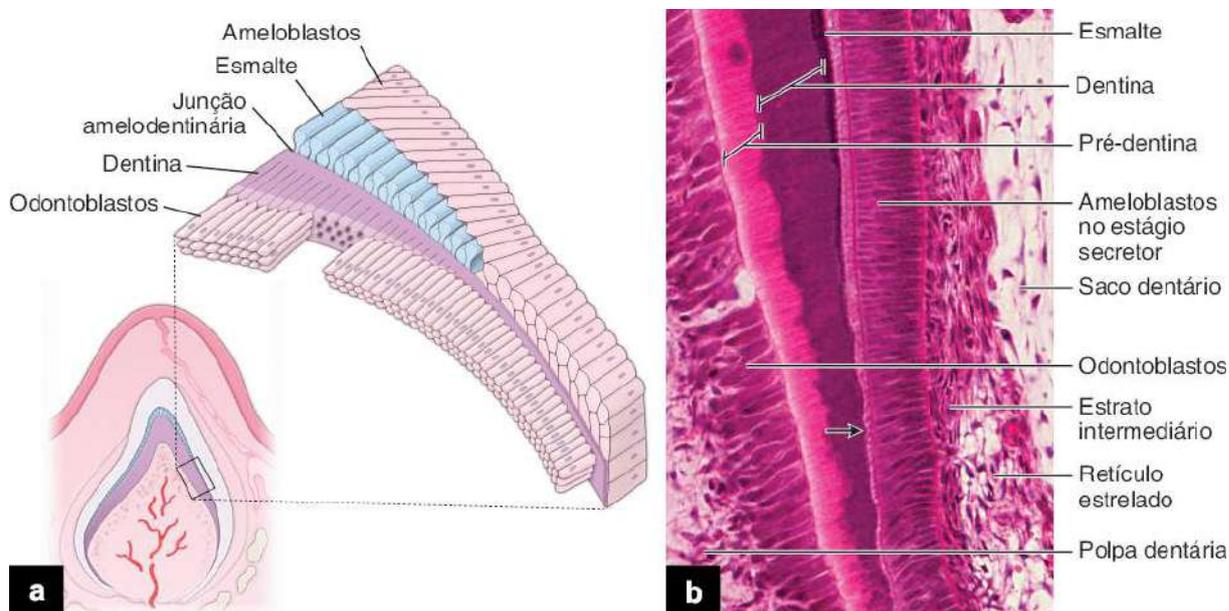


Figura 9 – Esquema e Micrografia da Interralação de Formação de Esmalte e Dentina. Coloração HE com aumento de 240x (WOJCIECH; PAWLINA, 2021).

A secreção de esmalte e dentina é representado acima comparando uma esquematização (a) e um corte histológico (b). A dentina é produzida pelos odontoblastos em estágio secretor inicial, seguida pela deposição de matriz de esmalte, por ameloblastos em estágio

secretor, sobre a superfície da dentina recém formada. Esses ameloblastos produzem matriz até toda a espessura futura do esmalte seja completada (WOJCIECH; PAWLINA, 2021).

3.2 A Composição do Esmalte e Dentina em Arranjo Molecular-Cristalográfico

Os componentes do esmalte e da dentina podem ser classificados em inorgânicos e orgânicos. Ambos os tecidos possuem composições inorgânicas parecidas, mas em proporções diferentes. E as principais variâncias de composições, propriamente ditas, são nas porções orgânicas (KIERSZENBAUM, 2016). O Tabela 1 resume e mostra a composição de esmalte e dentina.

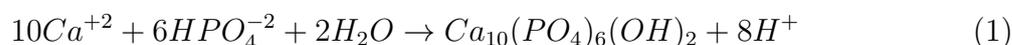
Tabela 1 – Composição dos Constituintes Amelodentinários

Tecido		Composição	Especificação	Características
Esmalte	Orgânico (1%)	Proteínas (1%)	amelogenina (90%)	processo de biomineralização do esmalte
			não amelogeninas (10%)	atividade da metaloproteinase
	Inorgânico (99%)	Minerais (97%)	água de solvatação	solvatação da hidroxiapatita
			hidroxiapatita	cristais em forma hexagonal
		$Ca^{+2}; PO_4^{-3}; Mg^{+2}; Na^+; F^-; K^+; CO_3^{-2}; C_6H_5O_7^{-3}; Cl^-;$	encontrados de forma amorfa	
Dentina	Orgânico (18%)	Fibras Colagenosas (90%)	tipo I (85%)	fibras colagenosas híbridas do tipo I e pequenos percentuais dos tipos III e V
			tipo III e V (5%)	
		Proteínas Não Colagenosas (10%)	família SIBLING	processo de biomineralização da dentina
	Inorgânico (82%)	Minerais (70%)	água de solvatação	solvatação das apatitas no colágeno
			hidroxiapatita	cristas em forma hexagonal
		$Ca^{+2}; PO_4^{-3}; Mg^{+2}; Na^+; F^-; K^+; CO_3^{-2}; C_6H_5O_7^{-3}; Cl^-;$	encontrados de forma amorfa	

Adaptado de (NANCI, 2008; KIERSZENBAUM, 2016; KATCHBURIAN, 2017; LACRUZ et al., 2017).

A composição inorgânica do complexo amelodentinário é, basicamente, constituída por apatitas, sendo a principal a HA. A HA estequiométrica se apresenta com uma fórmula genérica estrutural $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, seguindo a razão Ca/P de 1,67 com estrutura cristalina hexagonal, grupo espacial P63/m, fator de empacotamento super compacto de 74%. Contudo, as apatitas constituintes do dente não são estequiométricas, de modo em que pode haver diferenças na razão Ca/P, como, por exemplo, no esmalte de 1,63, na dentina de 1,61, e no osso de 1,71 (SENA, 2004). Os cristais de hidroxiapatita no osso e nos dentes não são estequiométricos, e por isso são, extremamente, permeados de defeitos,

comumente são deficientes de cálcio (DOROZHKIN; EPPLE, 2002). A precipitação de hidroxiapatita estequiométrica em faixa fisiológica com pH (6,0 a 7,4) ocorre de acordo com a equação 1 abaixo:



A célula unitária da hidroxiapatita corresponde à fórmula $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, e a sua forma cristalina exhibe três tetraedros de grupamentos fosfato coordenados com íons de cálcio formando uma estrutura hexagonal simétrica. Além disso, existe dois tipos de cálcio na rede cristalina, os que ocupam lugares normais Ca(1) e os Ca(2) que formam canais iônicos (Figura 10) (LACRUZ et al., 2017).

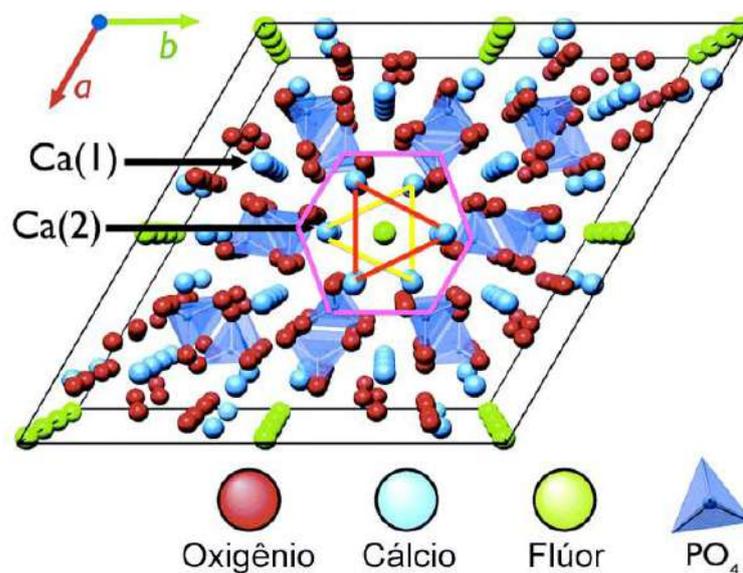
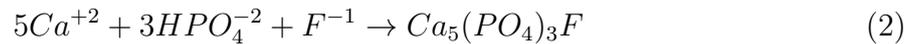


Figura 10 – Estrutura Cristalográfica da Hidroxiapatita. Adaptado de (LACRUZ et al., 2017).

Na Figura 10, a estrutura cristalina mostra simetria hexagonal, identificando dois tipos de sítios de cálcio. O sítio Ca(1) com sítios de Ca(2) em configuração triangular (linhas amarelas e vermelhas) criando canais ao longo dos quais os íons podem se mover (verde). Íons (verdes) como OH^- , Cl^- , CO_3^{2-} ou F^- podem preencher locais nos canais. F^- (o menor de todos), pode caber no triângulo formado pelos sítios de cálcio formando o canal; espécies de ânions maiores deformam a rede, significativamente, quando ocupam esses locais, levando a uma estabilidade da rede reduzida e, portanto, maior solubilidade. Assim, ainda existe possibilidade de substituições iônicas dentro dos cristais de apatitas, uma vez que as hidroxilas podem se difundir e serem substituídos por outros íons, o que caracteriza o caráter de adaptação das apatitas biológicas (DOROZHKIN; EPPLE, 2002).

Essas substituições podem gerar outras apatitas como a fluorapatita com fórmula estrutural de $Ca_{10}(PO_4)_6F$, na qual o íon de flúor (F^-) substitui a hidroxila (OH^-). E,

também, existe a substituição da hidroxila (OH^-) pelo íon carbonato (CO_3^{-2}) formando as hidroxiapatitas carbonatada tipo A (CHA-tipo A) e a substituições do grupo fosfato (PO_4^{-3}) pelo íon carbonato (CO_3^{-2}) formando las HA carbonatada tipo B (CHA-tipo B). No complexo amelodentinário são encontrados, principalmente, o fluorapatita e a CHA-tipo A (SENA, 2004). A equação (2) mostra a formação de fluorapatita.



Essas substituições iônicas influenciam, diretamente, na solubilidade química mineral, assim, enquanto o flúor consegue estabilizar a simetria hexagonal se realizando nos canais Ca (2) e suportar níveis ácidos de $pH = 4$ sem dissolução (devido a não presença da hidroxila), o carbonato diminui a simetria da célula resultando em ligações mais fracas, se tornando mais suscetível a dissolução ácida em um $pH = 5$ (LACRUZ et al., 2017). As equações abaixo mostram a apatita carbonatada com deficiência de cálcio (3) e a hidroxiapatita carbonatada com deficiência de cálcio (4):



A porção orgânica do complexo amelodentinário será diferente tanto para o esmalte quanto para a dentina. No esmalte, a matriz orgânica consiste em proteínas que vão compor e fazer a ação da biomineralização. As principais proteínas da matriz do esmalte dentário são: a amelogenina (90%), ameloblastina (8-10%) e enamulina (pequenos vestígios) (PAINE; SEAD, 2005; GRUENBAUM-COHEN et al., 2009). Além disso, ainda existem pequenas quantidades escassas de carboidratos e lipídeos; as proteínas não amelogeninas são formadas por dois grupos: as Fosfoproteínas Glicosiladas Ácidas (Enamulina e Tufelina) e as Glicoproteínas Sulfatadas (Ameloblastina, Amelina, Bainhalina, Amelotina, Apina) (NANCI, 2008).

Essas proteínas possuem caráter transitório na formação tecidual do esmalte, o que acaba dificultando a análise de mecanismos de biomineralização nesse tecido. Dessa forma, três modelos de biomineralização usando o método “*amelogenin-guide*” podem ser descritos. Esses modelos propõem que durante a amelogenese, o crescimento da hidroxiapatita seria direcionado pelo amelogenina, como: o modelo de formação de nanosfera de amelogenina, o modelo de interação nanosfera-cristalito (Figura 11) e modelo seguindo a interação proteína-mineral (Figura 12) (MORADIAN-OLDAK, 2012).

Na Figura 11 é representado em (a) o modelo da nanosfera, no qual a proteína amelogenina atua como estabilizante de grupamentos de fosfatos de cálcio. Assim, nanoes-

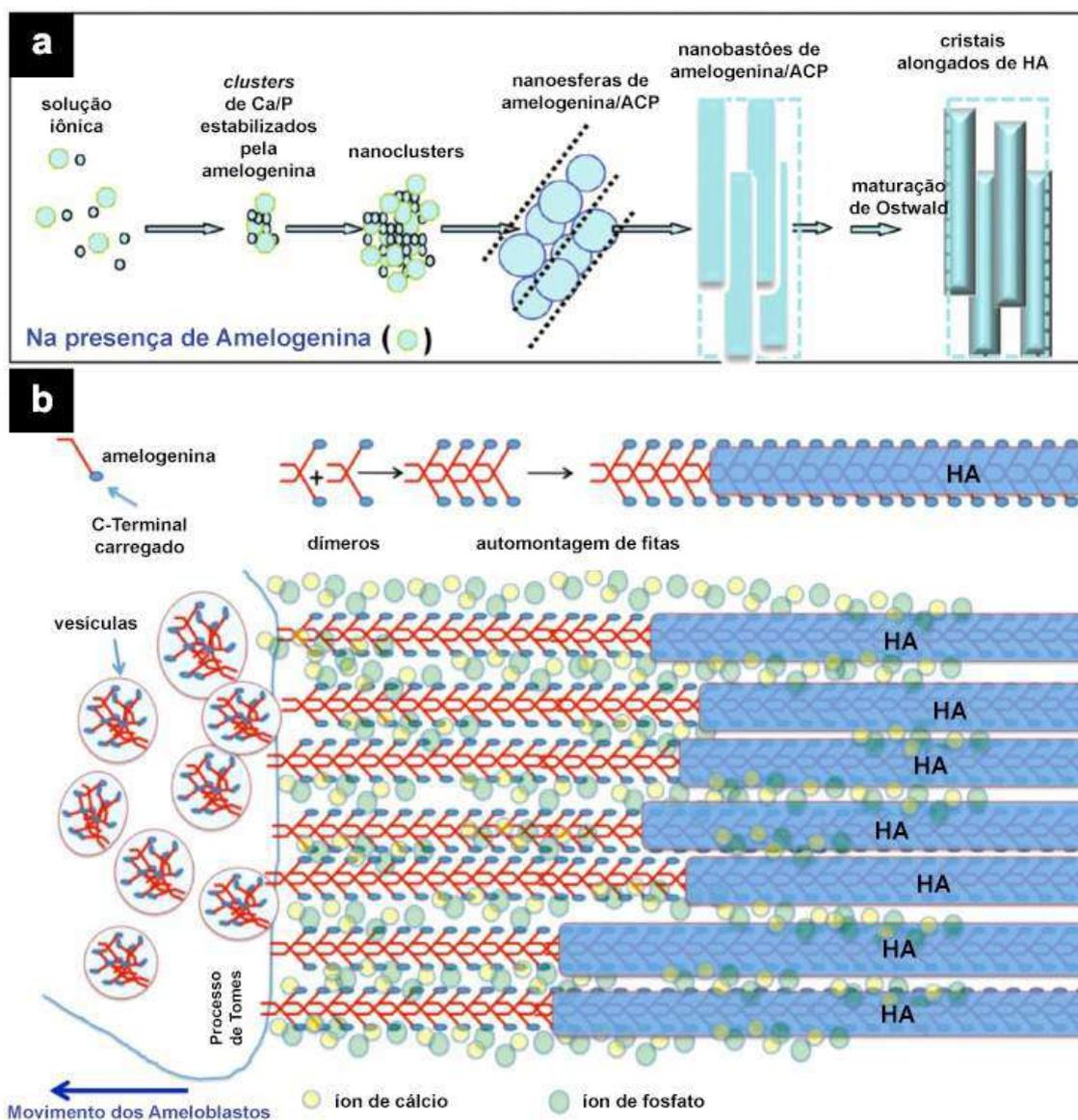


Figura 11 – Comparação dos Modelos *Amelogenin-Guide*. Adaptado de (YANG et al., 2010).

feras de amelogênina se organizam, se alinhando em cadeias, no qual os clusters de fosfato de cálcio amorfo se desenvolvem e, por meio de um processo de maturação, e se transforma no cristalito HA (FINCHAM; MORADIAN-OLDAK; SIMMER, 1999); em (b) o modelo nanosfera-cristalito representando o crescimento de cristal por nanofibras. Nesse sentido, a proteína amelogênina é secretada, por ameloblastos, em forma de dímeros antiparalelos (em vesículas). Assim, ocorre a formação de pontes iônicas entre os dímeros da amelogênina com Ca^{+2} e PO_4^{-3} . Nesse sentido, esses dímeros, quando excitados, são adicionados às fitas conforme os ameloblastos migram para longe da frente de biomineralização. E assim, a HA se forma, estreitamente, à membrana celular.

Na Figura 12 é apresentado um modelo proposto para a biomineralização do esmalte

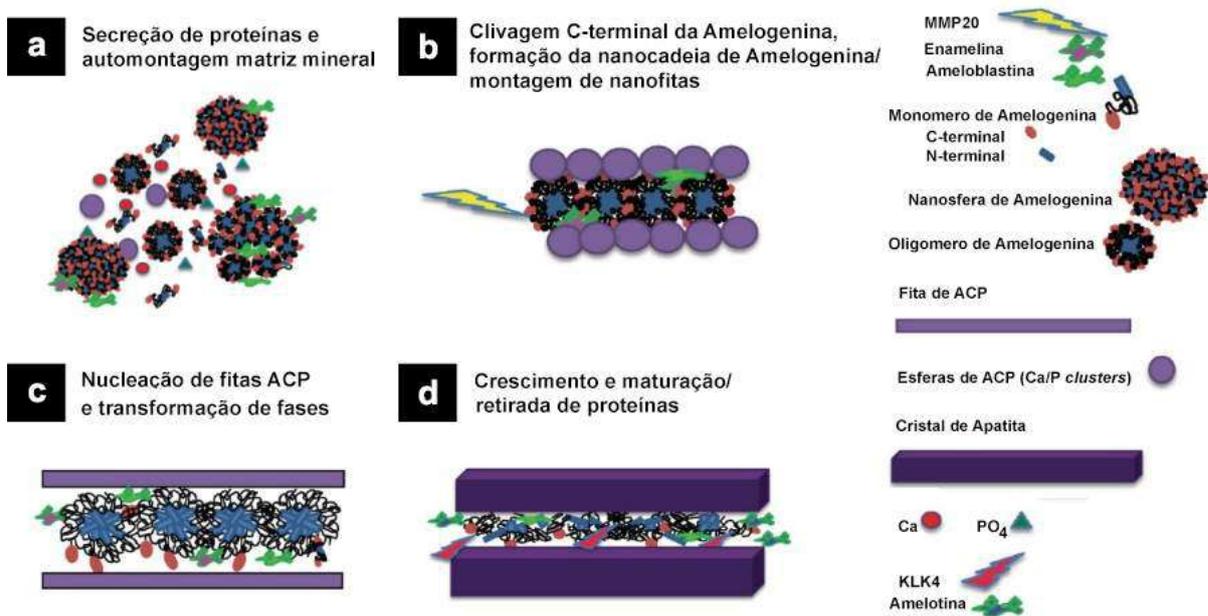


Figura 12 – Modelo de Biomíneralização Proteína-Mineral em Esmalte. Adaptado de (MORADIAN-OLDAK; GEORGE, 2021).

mediada por amelogenina; em (a) a amelogenina é secretada em forma monomérica ou oligomérica (dímero, trímero, hexâmero) e se agrupam, espontaneamente, em nanoesferas. Em seguida, os clusters de amelogenina-mineral se estabilizam com partículas amorfas de fosfato de cálcio; em (b) o terminal C da amelogenina é clivado por MMP20. Assim, os oligômeros se agregam, espontaneamente, em nanocadeias, promovendo a nucleação orientada de aglomerados de fosfato de cálcio (também pode ser formado estruturas semelhantes a nanofitas); em (c) os aglomerados de fosfato de cálcio coalescem para formar fitas ACP e, posteriormente, transformar-se em apatita cristalina; em (d) com a clivagem do terminal N da amelogenina, pela MMP20, a desmontagem das nanoesferas é promovida e a degradação adicional da amelogenina e de outras proteínas da matriz ocorre no estágio de maturação pela peptidase 4 (KLK4), permitindo um maior crescimento da HA em espessura.

A composição da matriz orgânica da dentina se estabelece por proteínas colagenosas e não colagenosas. As proteínas colagenosas correspondem a glicoproteínas que se arranjam em fibras colagenosas híbridas do tipo I e pequenos percentuais dos tipos III e V. Essas fibras colagenosas possuem, aproximadamente, $2,8 \times 10^2 \text{ nm}$ de comprimento e $3 \times 10^6 \text{ Da}$ e são compostas por três tipos de aminoácidos representados pela fórmula geral $[\text{Gly} - X - Y]_n$, na qual, para a dentina, são referentes à Glicina-Prolina-Hidroxiprolina (SILVA; PENNA, 2012; GITIRANA, 2013).

Essa unidade tripeptídica (Gly-Pro-Hyp) forma cadeias α longas que se associam com outras cadeias α e se rearranjam em uma tripla hélice formando as fibrilas cola-

genosas, de modo em que o conjunto dessas fibrilas em enrolamento helicoidal forma as fibras colagenosas, e, conseqüentemente, aumenta a resistência mecânica. Assim, essas fibras colagenosas do tipo I são formadas por duas cadeias polipeptídicas de $\alpha 1$ e uma de $\alpha 2$, formando a tripla hélice. Isso de modo em que cada cadeia se estruture com, aproximadamente, 1038 aminoácidos (Figura 13) (SORUSHANOVA et al., 2018).

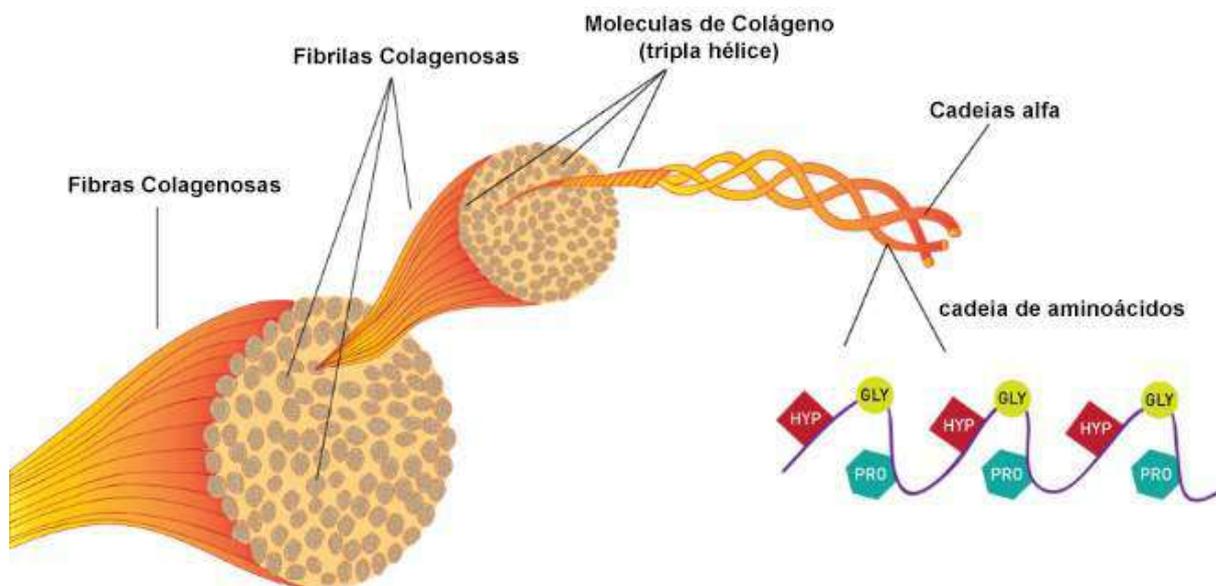


Figura 13 – Estrutura Molecular do Colágeno Fibrilar. Imagem mostrando a estrutura molecular de colágeno fibrilar com a organização de fibras, fibrilas, tripla hélice, α -hélice e aminoácidos. Adaptado. (autor desconhecido)

As Proteínas Não Colagenosas (NCP) se caracterizam por uma superfamília de proteínas da família SIBLING (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*), composta por: Proteína da Matriz Dentinária 1, 2 e 3 (DMP1, DMP2, DMP3), Sialofosfoproteína Dentinária (DSPP) Fosfoglicoproteína da Matriz Extracelular (MEPE), Osteopontina (OPN), Osteocalcina (OC), Osteonectina (ON) e Sialoproteína Óssea (BSP). Sendo a DSPP ainda clivada e subdividida em: Sialoproteína Dentinária-Glicoproteína Dentinária (DSP-DGP) e Fosfoproteína Dentinária (DPP); contudo são representadas, principalmente, pela proteína DSPP. Essas proteínas são, altamente, fosforiladas e participam do processo de mineralização da dentina (SUZUKI et al., 2012).

A proteína DSPP possui sinalização autócrina, ou seja, produz a própria ativação sendo clivada em proteínas menores que proporcionam e começam toda a cascata bioquímica de mineralização da dentina. Assim, a DSPP é clivada e subdividida no complexo Sialoproteína Dentinária-Glicoproteína Dentinária (DSP-DGP) e Fosfoproteína Dentinária (DPP). A DPP e as outras NCP guiam, em uma relação quantidade-dependente de colágeno - *collagen guide* - o processo de mineralização da dentina (NANCI, 2008; PRASAD; BUTLER; QIN, 2010).

Além disso, a DPP é a proteína mais abundante das NCP, possui caráter ácido, e na sua estrutura possui sequências repetidas de ácido aspártico (Asp) e fosfoserinas (Pse) formando sequências repetidas de $[Asp - Pse]_n$, $[Pse - Asp - Asp]_n$, e $[Asp - Pse - Pse]_n$. Assim, o seu papel na mineralização da dentina seria a sua ligação com átomos de Ca^{+2} , atraindo-os, e os apresentando às fibras colagenosas formando os cristais de hidroxiapatita (Figuras 14 e 15) (GULSEREN et al., 2019).

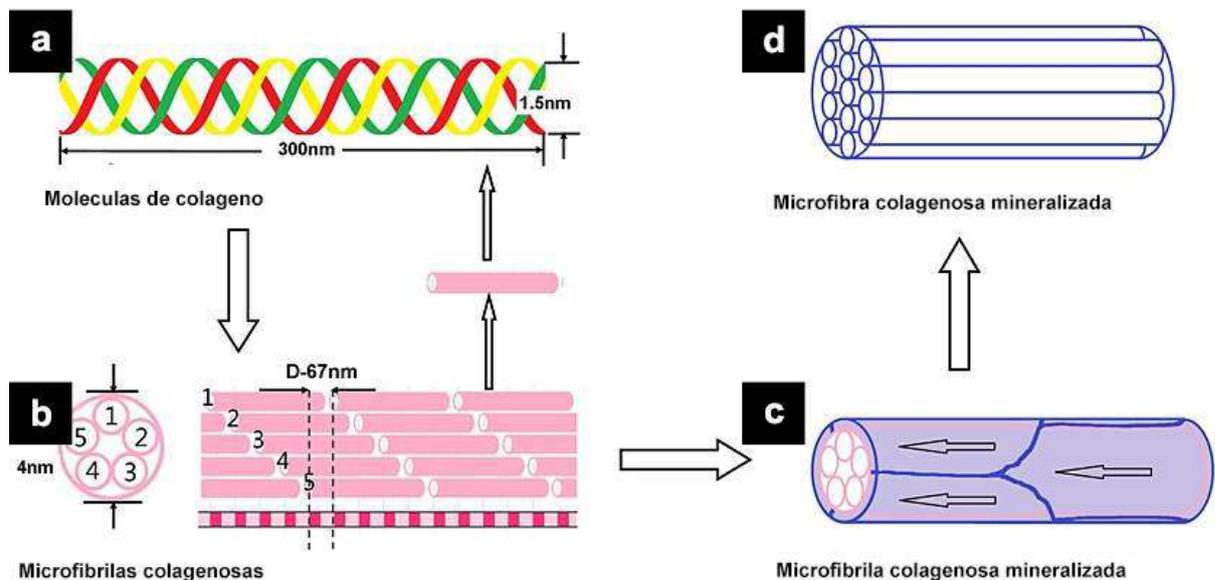


Figura 14 – Mecanismo de Formação da Dentina. Adaptado de (ZHONG et al., 2013).

A Figura 14 mostra em (a) estrutura em tripla hélice dos aminoácidos da molécula de colágeno; (b) arranjo das moléculas de colágeno em microfibrilas de colágeno, mostrando o período D e o tamanho das microfibrilas de colágeno; (c) cristais de HA crescem na superfície dessas fibrilas e são orientados ao longo eixo (longitudinal) das fibrilas; (d) organização das fibrilas de colágeno mineralizadas.

A inclusão de hidroxiapatita às fibras colagenosas proporciona o processo de biomineralização da dentina, isso mesmo com as fibras colagenosas possuindo organização complexa. Diagrama esquemático da automontagem hierárquica de nano-fibrilas de colágeno mineralizado (ZHONG et al., 2013).

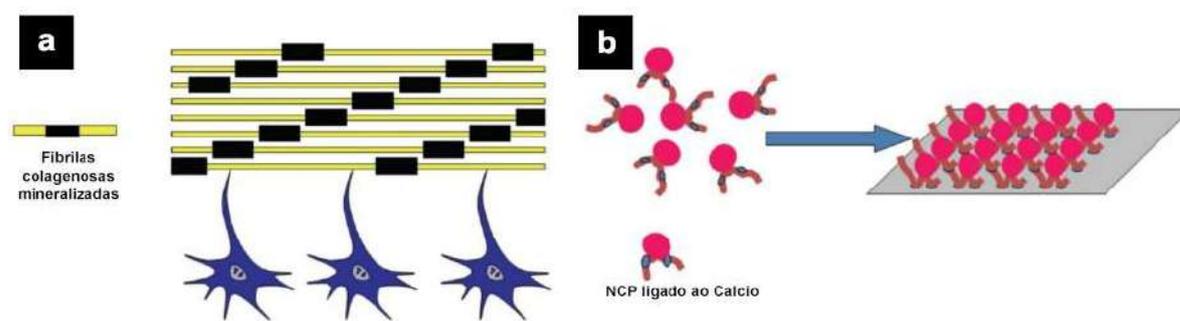


Figura 15 – Modelo de Biomíneralização Proteína-Mineral em Dentina. Adaptado de (MORADIAN-OLDAK; GEORGE, 2021).

A dentina e os tecidos ósseos (derivados de tecidos conjuntivos) são formados por mineralização mediada por matriz. Assim, a imagem acima mostra em (a) a formação de tecido dentinário e ósseo como eventos mediados por células. Dessa forma, os componentes secretados por osteoblastos/odontoblastos são responsáveis pela formação de tecido calcificado (barras amarelas representam fibrilas de colágenas e as barras pretas representam o mineral de fosfato de cálcio). Em (b) é identificado que as proteínas não colágenas possuem a capacidade de se ligar ao Ca^{+2} ; esses *nanoclusters* presumidamente se localizam em moldes automontados, como o colágeno, e fornecem a superfície estrutural para a nucleação mineral.

3.3 Propriedades Mecânicas do Complexo Amelodentinário

Os dentes, de forma geral, são órgãos que possuem elevada dureza e resistência mecânica. De modo funcional, os movimentos e cargas da mastigação conseguem chegar a valores de, aproximadamente, 800N. Além disso, o esmalte e dentina são tecidos que, embora façam parte do mesmo órgão, possuem propriedades mecânicas específicas que caracterizam a especificidade da sua composição (HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ; ROMERO-ÁNGELES; URRIOLAGOITIA-CALDERÓN, 2018).

Dentre as propriedades mecânicas, pode-se destacar, principalmente, as propriedades elásticas (como o módulo de elasticidade, módulo de cisalhamento e o coeficiente de Poisson), que condizem em como um material suporta uma carga e se recupera quando essa carga é removida, sem que haja deformação; a dureza, que condiz a uma medida, propriamente dita, em diferentes escalas, além de mostrar a capacidade desse dente consegue resistir a deformação elástica, plástica e fratura (ZHANG et al., 2014).

No esmalte e dentina, o módulo de elasticidade, também conhecido como módulo

de Young, representa a relação entre a força normal e a cisalhante, é de aproximadamente, 70GPa e 18,3GPa, respectivamente. Ambos os tecidos apresentam o mesmo coeficiente de Poisson que é de 0,30 (relação entre a deformação de contração transversal e a deformação da extensão longitudinal na relação de força de alongamento), e os valores de densidade para cada um, respectivamente, é de $0,25g/cm^3$ e $0,31g/cm^3$ (HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ; ROMERO-ÁNGELES; URRIOLAGOITIA-CALDERÓN, 2018).

O esmalte apresenta propriedades anisotrópicas de modo em que dentro de um mesmo prisma de esmalte existe diferença, no sentido cabeça-cauda do módulo de elasticidade e da dureza. Essas propriedades são maiores na cabeça do bastão do que na porção caudal (JENG et al., 2011). O esmalte apresenta dureza máxima de 3,5GPa em sua superfície, e à medida que vai migrando para a região amelodentinária, essa dureza vai diminuindo. Assim, a média é, aproximadamente, 2GPa à 2,5GPa à uma distância de 100 μ m à 600 μ m da junção amelodentinária (Figura 16) (ZHANG et al., 2014).

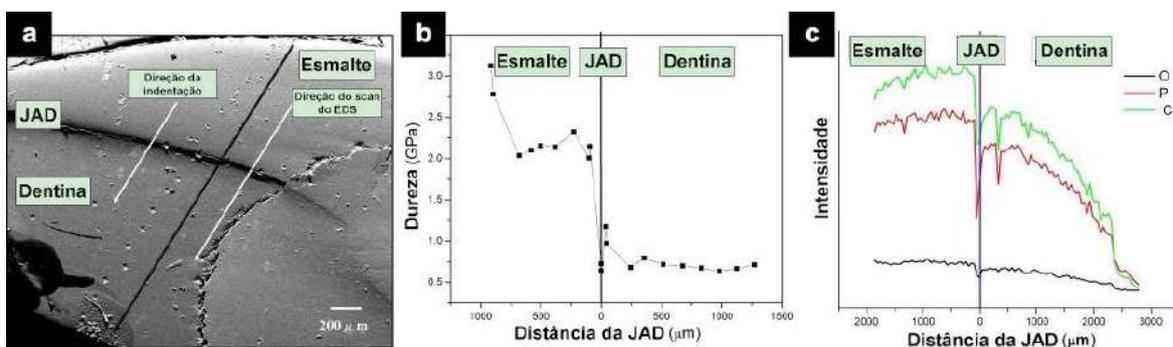


Figura 16 – Indentação de Dureza Vickers no Complexo Amelodentínario. Adaptado de (ROY; BASU, 2008).

Na Figura 16 é identificado em (a) a imagem de MEV mostrando indentações de dureza Vickers ao longo da linha do esmalte à dentina; (b) valores de dureza medidos contra a distância da junção amelodentínaria (JAD); (c) variação da composição medida ao longo da linha paralela à linha de indentação.

Além disso, existem variações dessas propriedades com a idade, uma vez que com o processo de envelhecimento o conteúdo mineral da dentina aumenta e a espessura do esmalte diminui (PARK et al., 2008). A nanodureza e o módulo de elasticidade que diminuem da superfície para a junção amelodentínario mantendo uma relação proporcional com a quantidade Ca^{+2} e com a direção do prisma de esmalte (Figura 17) (JENG et al., 2011). Nesse sentido, também pode ser percebido como a relação entre a dureza e a densidade diminuem em sentido do esmalte à junção amelodentínaria (Figura 18) (HE; HAO, 2010). No entanto, esses resultados podem ser obtidos em direção paralela e perpendicular. Assim, nos ensaios de dureza, quando a direção da indentação é paralela às hastes, a dureza é $3,9 \pm 0,3GPa$ e o módulo de elasticidade é $87,5 \pm 4,5GPa$, já quando a

direção da indentação é perpendicular os valores mudaram, respectivamente, $3,8 \pm 0,4\text{GPa}$ e $72,7 \pm 4,5\text{GPa}$ (HABELITZ et al., 2001; IVANCIK et al., 2012).

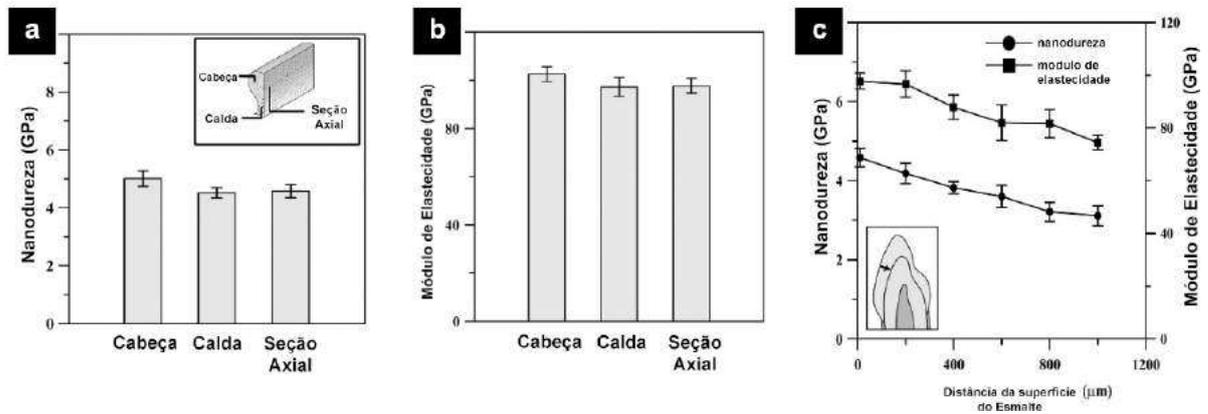


Figura 17 – Nanoindentação de Bastões de Esmalte. Adaptado de (JENG et al., 2011).

Na Figura 17 é evidenciado em (a) a nanoindentação, (b) módulo de elasticidade dos prismas de esmalte; (c) propriedades mecânicas dos prismas de esmalte na posição topológica ao longo do eixo longitudinal do prisma de esmalte da superfície externa em direção à junção amelodentinária. Observação: Nanoindentação feita com o Nanoindenter XP (MTS Systems Corp, Minneapolis, MN, EUA) produz valores mais elevados de dureza de 6-7 GPa e módulo de elasticidade de 120-130 GPa.

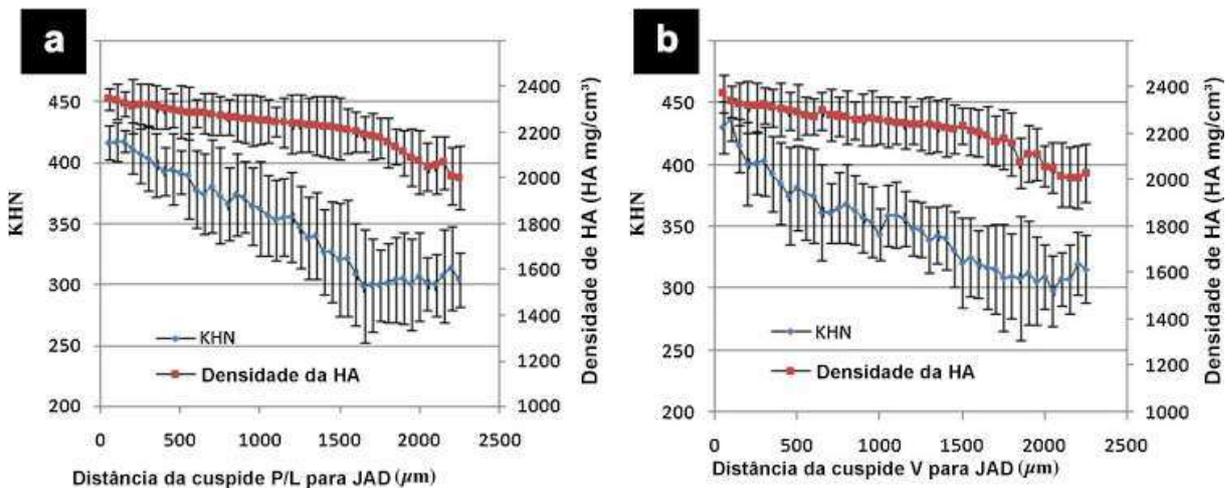


Figura 18 – Densidade e Dureza Knoop do Esmalte. Adaptado de (HE; HAO, 2010).

Na Figura 18 é identificado em (a) e (b) a densidade HA e Dureza Knoop (KHN) com distância do esmalte para a junção amelodentinária para o esmalte na face palatina/lingual e vestibular, respectivamente. A densidade e KHN de HA diminuem, simultaneamente, da cuspide dentária para a junção amelodentinária, e as duas propriedades são, altamente,

correlacionadas. Na face vestibular a diminuição foi de 29,5% e na lingual de 26,4; diferença não significativa.

A dentina apresenta semelhanças de propriedades microestruturais e anisotrópicas, assim como o esmalte, contudo possui uma organização mais complexa. Isso de modo em que não vai se tratar apenas da conformação de prismas de apatita em sua localização em relação à superfície à junção amelodentinária, mas da direção dos túbulos dentinários, e assim direção das fibras colagenosas, da densidade da fase mineral e da localização da junção amelodentinária até à camada mais superficial em direção à polpa (COHEN et al., 2008).

A dentina peritubular apresenta alto grau de mineralização e módulo de elasticidade, aproximadamente, de 40 ± 2 GPa, enquanto a dentina intertubular possui grau de mineralização baixo com o módulo de elasticidade em torno de 17 GPa (ZISKIND et al., 2013). Perto da junção amelodentinária, a dentina apresenta uma microdureza baixa, e à medida em que se adentra em sentido à polpa, a microdureza aumenta um pouco, e depois decai novamente. Logo, entende-se que a dureza e o módulo de elasticidade da dentina são maiores em uma região central interna da dentina (terço médio), e a medida em que se direciona para áreas periféricas, essas propriedades diminuem (Figura 19). Além disso, comparando os tipos de dentina, pode-se observar que a dureza diminui, gradativamente, do túbulo dentinário para a dentina intertubular, isso corresponde, e está diretamente proporcional, com a diminuição do conteúdo mineral (IVANCIK et al., 2012).

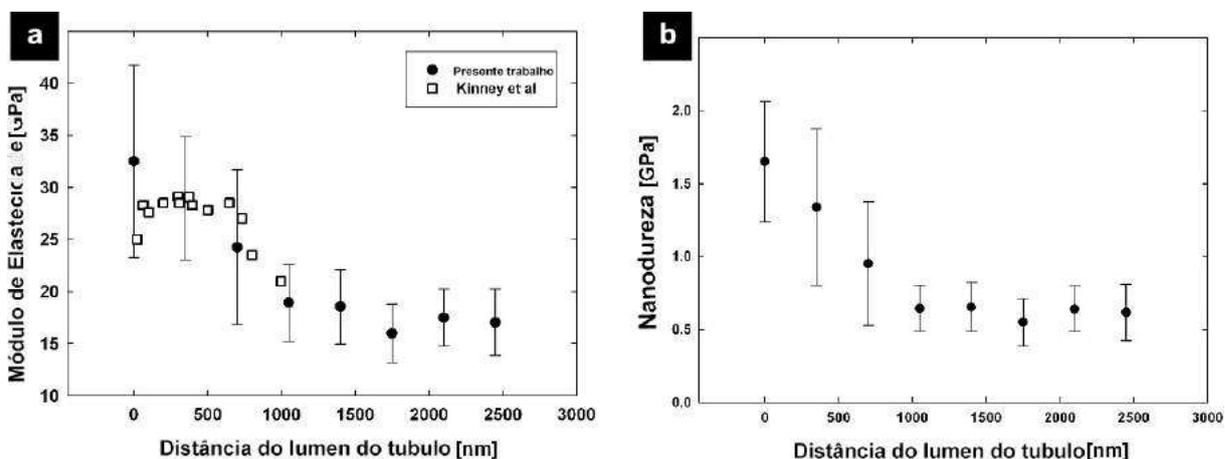


Figura 19 – Nanoindentação da Dentina. Adaptado de (ZISKIND et al., 2013).

Na figura 19 é apresentado em (a) módulo de elasticidade médio e (b) a nanoindentação da dentina, medidos por indentação em cada um dos oito espaçamentos de 350nm da borda do lúmen de um túbulo de dentina; além disso, também, é mostrado o desvio padrão das 14 medições feitas em cada espaçamento; dados do módulo de (KINNEY et al., 1999). são sobrepostos no gráfico de módulo de elasticidade para comparação.

Em ambientes úmidos, a dentina apresenta características anisotrópicas e módulo de elasticidade de, aproximadamente 25,1GPa em direção perpendicular aos túbulos dentinários, enquanto em ambientes secos, ela se torna isotrópica e o módulo de elasticidade é de 28,1GPa. Ainda nessa perspectiva entre ambiente seco e úmido, a dentina diminuiu o módulo de elasticidade em 35% e a dureza em 30% em ambiente hidratado. O que caracteriza as propriedades mecânicas da dentina sendo ambiente dependente (ZHANG et al., 2014).

Além disso, complexo amelodentinário é um sistema muito heterogêneo, isso de modo em que existe uma diferença na disposição e composição de apatitas entre as camadas teciduais do dente. O esmalte é um tecido com alta dureza, mas com pouca ductilidade e tenacidade, o que o caracteriza como um tecido, altamente, friável. Assim, de modo complementar, a dentina possui uma dureza menor e uma ductilidade e tenacidade maior, justamente, para suportar e ajudar a dissipação de cargas no esmalte (cargas da mastigação), evitando que o mesmo frature.

3.4 Apatitas e Rotas de Síntese por Via Úmida

As apatitas, enquanto biomateriais, precisam responder ao princípio de biocompatibilidade com os tecidos nos quais entram em contato. Isso condiz com a capacidade de não provocar reação de corpo estranho, permitindo e exercendo função em uma determinada aplicação (OTHMAN et al., 2018).

Parte desses biomateriais, a base de fosfato de cálcio, se caracterizam como bioativos pois possuem sua composição histológica e cristalográfica, assim como a resposta biológica, semelhante ao tecido in vivo. Isso de modo em que permitem uma interação bioquímica entre o tecido e o biomaterial. Além disso, os materiais bioativos são indutores de atividades biológicas, totalmente, específicas formando uma interface tecido-biomaterial (SINHORETI; VITTI; SOBRINHO, 2013). A Tabela 2 mostra as principais atividades de estímulo biológico entre os biomateriais e tecido conjuntivos mineralizados.

Tabela 2 – Atividades Biológicas dos Biomateriais

Função Biológica	Descrição	Componente de Interação	Resposta Tecidual
Gênese	formação de tecido conjuntivo mineralizado com a interação celular	células especializadas (produtoras de matriz)	formação e remodelação tecidual
Indução	estímulo de diferenciação de células formadoras de tecido conjuntivo mineralizado	células mesênquimas (não diferenciadas)	crescimento ou formação tecidual onde não há tecido
Condução	aposição de elementos constituintes sobre a arquitetura tecidual	tecido conjuntivo mineralizado pré existente	neoformação tecidual onde já há tecido

Adaptado de (LEGEROS, 2008; SINHORETI; VITTI; SOBRINHO, 2013).

Esses biomateriais à base de fosfato de cálcio possuem boas interações com os

tecidos mineralizados e apresentam propriedades que auxiliam na integração da interface biomaterial-tecido conjuntivo mineralizado. Assim, se pode destacar a bioatividade (estímulo de função e expressão de um biomaterial semelhante ao tecido ósseo na interface biomaterial-tecido) e condutividade (capacidade de interagir com proteínas da matriz extracelular óssea e promover estímulo de formação óssea) (ROCHA et al., 2017).

De forma geral, as apatitas seguem a fórmula genérica de estrutura $[M_{10}(XO_4)_6Z_2]$ e pertencem a classe de fosfato de cálcio que são biomateriais muito bem aceitos em aplicações biomédicas devido a sua alta biocompatibilidade e por fornecerem uma boa integração com os tecidos adjacentes. Além disso, essas classes de fosfato de cálcio possuem uma razão Ca/P variante em torno de 0,5 a 2,0 (Tabela 3) (DOROZHKIN, 2017).

Tabela 3 – Fases de Fosfato de Cálcio de acordo com a Razão Molar

Razão Molar [Ca/P]	Formula Estrutural $[M_{10}(XO_4)_6Z_2]$	Componentes	Sigla	Resposta Biológica
0.5	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	Fosfato Monocálcico Monohidratado	MCPM	forte atividade macrofágica
0.5	$Ca(H_2PO_4)_2$	Fosfato Monocálcico Anhidro	MCPA	forte atividade macrofágica
1.0	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	Fosfato Dicálcico Dihidratado (Brushita)	DCPD	forte atividade macrofágica
1.0	$CaHPO_4$	Fosfato Dicálcico Anhidro (Monetita)	DCPA	forte atividade macrofágica
1.33	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	Fosfato Octacálcico	OCP	reabsorvível
1.5	$\alpha - Ca_3(PO_4)_2$	α -Fosfato Tricálcico	α -TCP	reabsorvível
1.5	$\beta - Ca_3(PO_4)_2$	β -Fosfato Tricálcico	β -TCP	reabsorvível
1.2 - 2.2	$Ca_xH_y(PO_4)_z \cdot nH_2O$, n=3 - 4,5;15 - 20% H_2O	Fosfato de Cálcio Amorfo	ACP	reabsorvível
1.5 - 1.67	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$	Hidroxiapatita Cálcio Deficiente	CDHA	bioativo
1.67	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	Hidroxiapatita	HA	bioativo
1.67	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	Fluorapatita	FA	bioativo
1.67	$Ca_{10}(PO_4)_6O$	Oxiapatita	AO	bioativo
2.0	$Ca_4(PO_4)_2O$	Fosfato Tetracálcico (Hilgenstockite)	TTCP	sem relevância clínica

Adaptado de (DOROZHKIN, 2017).

Contudo, algumas características das apatitas precisam ser levadas em consideração quando se pensa em aplicações biomédicas como a composição, cristalinidade (tamanho, morfologia e distorção) e solubilidade. Esses parâmetros afetam a taxa de dissolução do biomaterial (FONSECA et al., 2009). Nesse sentido, a alteração desses parâmetros estão, diretamente, proporcionais com a quantidade e tamanho dos substituintes. Isso de modo que a elevação da taxa de dissolução é influenciada pela diminuição desses parâmetros, ou seja, uma diminuição da apatita e da área de contato superficial e assim maior contato. Assim, com uma baixa cristalinidade se eleva a solubilidade pela redução do tamanho e/ou distorção do cristal (LEGEROS, 1991; HENCH; WILSON, 1993). A Tabela 4 mostra algumas propriedades de solubilidade dos fosfatos de cálcio e a Figura 20 e Figura 21 mostra o diagrama de estabilidade de Hidroxiapatita

Tabela 4 – Solubilidade dos Fosfatos de Cálcios

Sigla	Solubilidade a 25°C (g/L)	Solubilidade a 25°C [-log(Ks)]	Solubilidade a 37°C [-log(Ks)]	Estabilidade em pH a 25°C	Densidade (g/cm ³)
MCPM	≈18	1,14	-	0 - 2	2,22
MCPA	≈17	1,14	-	acima de 100°C	2,58
DCPD	≈0,088	6,59	6,63	2 - 6	2,32
DCPA	≈0,048	6,90	7,02	acima de 100°C	2,89
OCP	≈0,0081	96,6	95,9	5,5 - 7	2,61
α-TCP	≈0,0025	25,5	25,5	b	2,86
β-TCP	≈0,0005	28,9	29,5	b	3,08
ACP	a	25,7	25,7	≈5 - 12	-
CDHA	≈0,0094	≈85	-	6,5 - 12	-
HA	≈0,0003	116,8	119,2	9,5 - 12	3,16
FA	≈0,0002	120	-	7 - 12	3,20
AO	≈0,087	≈69	-	b	≈3,20
TTCP	≈0,0007	38 - 44	37-42	b	3,05

a = não pode ser medido com precisão; b = não precipitável em solução aquosa. Adaptado de (DOROZHKIN, 2017).

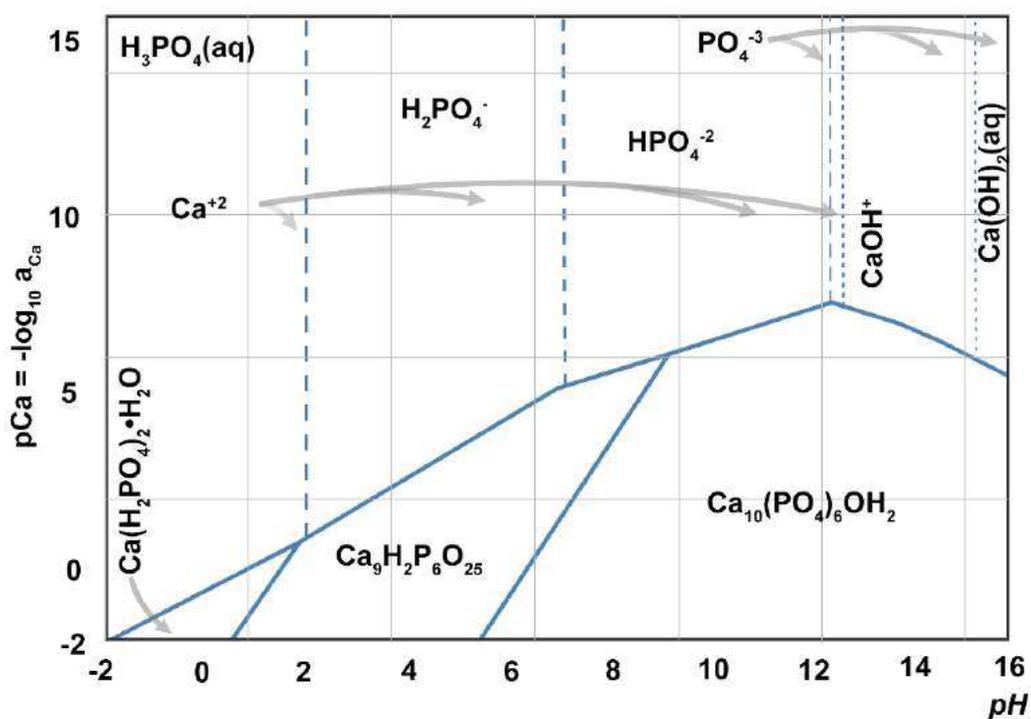


Figura 20 – Diagrama de Estabilidade do Sistema $Ca - P - H_2O$ da Hidroxiapatita a 37°C. Elaborado pelo autor. Adaptado de (BASTOS et al., 2001).

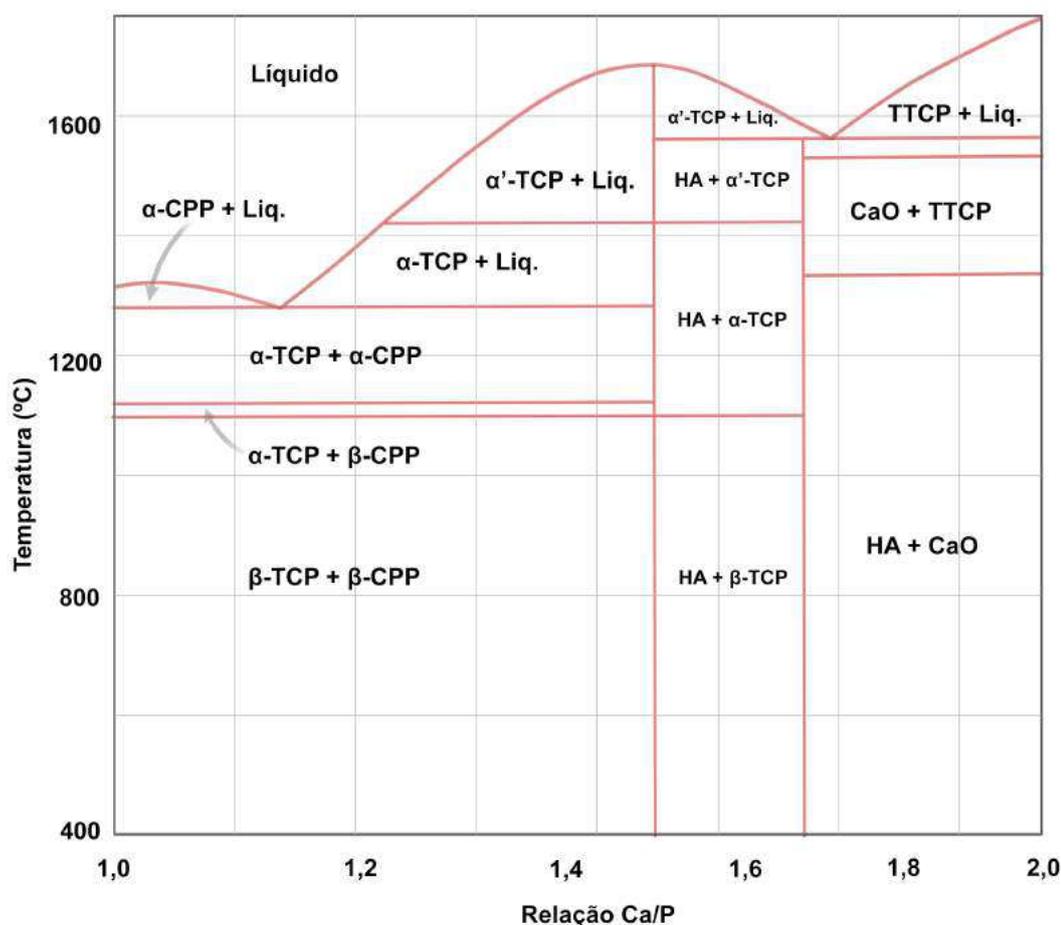


Figura 21 – Diagrama de Fases do Sistema Ca-P. Elaborado pelo autor. Adaptado de (HENCH, 2001).

Dessa forma, a HA, enquanto uma cerâmica bioativa, possui estrutura cristalina hexagonal super compacta com valores de $a = 9,423$ e $c = 6,875$, isso quando preparada por reação de precipitação aquosa seguida de sinterização a 1100°C . Sendo assim, a célula unitária possui dez grupos de cálcio (Ca^{+2}), seis grupos fosfato (PO_4^{-3}) e dois grupos de hidroxila (OH^{-}) (EBRAHIMI; BOTELHO; DOROZHKIN, 2017). Nesse sentido, os espectros de absorção de onda de infravermelho dos fosfatos de cálcio podem ser observados na Tabela 5 e na Figura 22. Além disso, a HA possui valor de dureza Vickers, aproximadamente, de 500HV , e densidade de $3,16\text{g}/\text{cm}^3$ (RIBEIRO et al., 2021).

Tabela 5 – Frequências de Absorção de Espectro Infravermelho dos Fosfatos de Cálcio

Grupamentos	Número de Ondas (cm^{-1})
PO_4^{-3}	474, 562, 580, 600, 640 e 960-1200
P-OH	527, 870 e 910-1040
CO_3^{-2} (substituição do tipo A)	880, 1450 e 1514
CO_3^{-2} (substituição do tipo B)	870, 1412 e 1465
OH^- (livre)	630 e 3569
OH^- (H_2O)	1600-1650 e 3000-3700

Adaptado de (RIBEIRO et al., 2021).

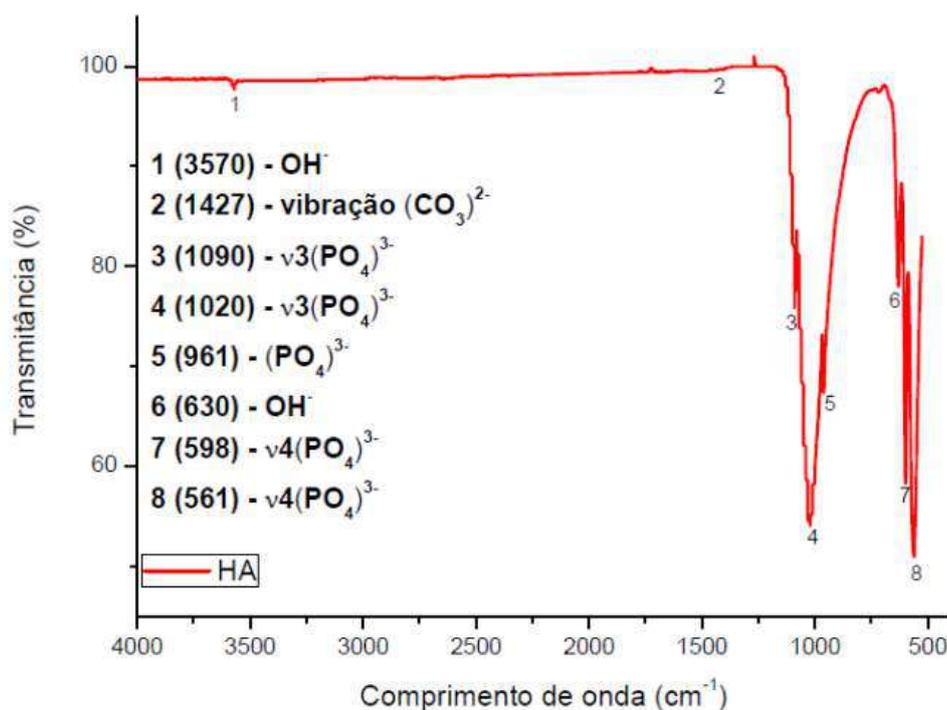


Figura 22 – Espectroscopia Infravermelha de Transformada de Fourier de Pastilhas de Hidroxiapatita (RIBEIRO et al., 2021).

No FTIR acima há presença de hidroxila, em, aproximadamente, 3570cm^{-1} , associada ao modo de vibração ν_1 de estiramento simétrico (banda característica da HA); as bandas intensas que aparecem nas amostras em torno de 1090cm^{-1} e 1020cm^{-1} são respectivas do modo de estiramento assimétrico dos fosfatos $\nu_3(\text{PO}_4)^{3-}$; a banda de 960cm^{-1} é devida ao estiramento simétrico dos fosfatos $\nu_1(\text{PO}_4)^{3-}$; as bandas em 598cm^{-1} e 561cm^{-1} são relativas aos modos de deformação assimétrica dos fosfatos $\nu_4(\text{PO}_4)^{3-}$.

Os métodos de síntese da hidroxiapatita influenciam nas propriedades mecânicas e biológicas. Dessa forma, a HA sintética pode ser sintetizada por via aquosa de precipitação,

por hidrólise, síntese hidrotérmica, método sol-gel, reação de fase sólida ou até mesmo a partir de outros fosfatos de cálcio. Nesse sentido, os parâmetros regulantes como a estequiometria, pH , temperatura ou até o tempo de envelhecimento são os que devem ser levados em consideração (MOURA et al., 2012; EBRAHIMI; BOTELHO; DOROZHKIN, 2017).

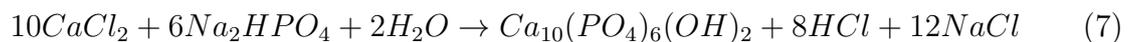
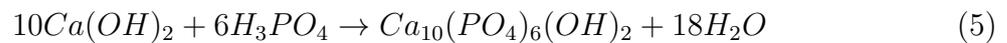
Assim, dentre os métodos de síntese de HA, a via úmida se estabelece como um dos principais, e mais usados, pois consegue propor a produção da HA com baixa, ou ausente, cristalinidade. Isso se torna fundamental ao que implica em aplicações biomédicas devido ao princípio de biocompatibilidade. Além disso, os métodos de via úmida podem ser divididos em três: precipitação, hidrotermal e sol-gel (RIBEIRO et al., 2021).

O método de precipitação por via úmida se estrutura, basicamente em dois tipos de reações químicas: neutralização (reação de um ácido e uma base gerando um sal e água) e hidrólise salina (reação de sais de cálcio com sais de fosfato gerando sais e um ácido e/ou base fracos) (Tabela 6).

Tabela 6 – Obtenção de Hidroxiapatita via Precipitação Aquosa

Método de Precipitação			
Reação	Método	pH	Propriedades
Neutralização (ácido e base)	ácido fosfórico sobre a suspensão de hidróxido de cálcio sob agitação.	utiliza-se uma base forte para manter o pH acima de 10.	partículas pequenas (menor que 1 μm), baixa cristalinidade, alto teor de pureza, ausência de fases secundárias.
Hidrólise de fosfato de cálcio (sais de fosfato de cálcio)	reação de sais de cálcio com sais de fosfato sob agitação.	utiliza-se uma base fraca para manter o pH acima de 10.	partículas pequenas (menor que 10 μm), baixa cristalinidade, baixo teor de pureza, forma fases secundárias. Adaptado de (ORTIZ et al., 2016).

A reação (5) mostra a síntese de HA por via reação de neutralização enquanto as reações (6) e (7) mostram a obtenção HA por hidrólise de fosfato de cálcio.



Além disso, como base forte para estabilização do pH e, conseqüentemente, precipitação da HA, pode ser utilizado hidróxido de amônio (NH_4OH), hidróxido de potássio (KOH) e o hidróxido de sódio (NaOH) (ROCHA et al., 2017). Isso pode ser observado no diagrama de estabilidade na Figura 23.

3.5 Funcionalização de Fosfatos de Cálcio com Peptídeos Biomiméticos

O uso de peptídeos, como funcionalizantes, de biomateriais tem sido uma estratégia adotada pela engenharia de tecidos para conseguir promover uma maior interação entre biomateriais-tecidos. Quando direcionado para a funcionalização da HA e CaP, isso condiz com o aumento de bioatividade, principalmente, a nível de condução, e, sendo assim, o aumento de precipitados a nível tecidual para promover biomineralização (ZHU et al., 2016).

Assim, estratégias tentaram buscar a reconstrução tecidual a partir da funcionalização de fosfatos de cálcio, seja com peptídeos ou proteínas, que são estruturas responsáveis por regular e estabilizar a mineralização. Nesse sentido, essa biomineralização não vai ser caracterizada pela nucleação do cristal convencional, com a agregação de íons, átomos ou moléculas, se aglomerando em núcleos para se proliferam e formam a estrutura tecidual (FAN; MORADIAN-OLDAK, 2009; NUDELMAN et al., 2013; HE et al., 2019).

Isso se justifica uma vez que os tecidos do complexo amelodentinário, por não possuírem células e, assim, são tecidos acelulares, por isso não conseguem promover essa nucleação da mesma forma, que em enxertos ósseos, por exemplo. Isso porque não possuem células, proteínas e fatores de crescimento específicos que existem no tecido ósseo (FAN; MORADIAN-OLDAK, 2009; NIU et al., 2014). E isso é compatível com as atividades de gênese e indução, e não com condução.

Desse modo, a formação de precipitações, em cima de superfícies bioativas, ocorre por meio da interação de grupamentos amorfos de CaP. Essa biomineralização ocorre a partir de precipitações de partículas para a formação de um único cristal de apatita. E como se trata de uma atividade de condução, e não dependente de células, a biomineralização precisa ocorrer no ambiente da reação (ZHU et al., 2016).

Nesse sentido, como as proteínas utilizados in natura para a biomineralização do complexo amelodentinário não existem mais no corpo humano, se foi constituído o uso de peptídeos análogos biomiméticos desses tecidos para a funcionalização de fosfatos de cálcio. Esses peptídeos biomiméticos atuam como Precursores Líquidos Induzidos por Polímero (PILP), no qual capturam aglomerados se agregando ainda mais em nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo. Sendo assim, esses grupamentos de fosfato de cálcio amorfo adentraram nos compartimentos teciduais promovendo a biomineralização (NIU et al., 2014; FANG et al., 2021).

Assim, os PILP's são moléculas polianiônicas, de caráter anfífilico, que possuem grupos com ácido carboxílico, e por isso conseguem promover sítios ativos que interagem com minerais de cálcio. Os PILP's sequestram íons para induzir um precursor amorfo,

no qual esses precursores minerais amorfos semelhantes a líquidos se ajustam a forma da superfície bioativa em que são depositados, penetrando para formar precipitações (HE et al., 2019). A partir disso, conseguem controlar a cinética química, forma e direção, e polimorfismos do fosfato de cálcio (NIU et al., 2014).

O uso de PILP surgiu como um sistema biomimético para a mineralização de fibras colagenosas do tipo I. No qual se identifica uma etapa de formação de nanopartículas atuando como nanoprecursores amorfos que podiam atuar assumindo a forma de seus recipientes. Isso de modo que a principal característica do PILP é seu estágio inicial que atua com a coalescência de gotículas precursoras que, ao invés de fazerem um crescimento átomo por átomo, se agregam, fluindo como um líquido levemente viscoso, fazendo o crescimento de partículas. Isso condiz que ao invés das nanopartículas se aglomerarem formando uma estrutura multiparticulada, elas coalescem para formar uma gota maior até se tornarem muito solidificadas para coalescer completamente. Além disso, o sucesso de uso da funcionalização com de PILP's consiste em encontrar de peptídeos biomiméticos (com carga negativa) que estabilizam nanopartículas precursoras amorfas (GOWER, 2008).

Assim, utilizando a metodologia biomimético do PILP, Gower e colaboradores conseguiram propor modelos de biomineralização com diversas matrizes orgânicas com carbonato de cálcio e fosfato de cálcio, assim como, por exemplo, a biomineralização intrafibrilar de fibras colagenosas por apatita carbonatada. Contudo, embora o PILP possa ser usado na reconstituição de dentina, quando utilizado para esmalte podem acabar comprometendo a integridade da dureza e resistência desse tecido. Isso uma vez que se trata de um tecido quase que, totalmente, inorgânico, e a porção orgânica dos PILPs poderiam comprometer a resistência mecânica do esmalte (KIM; DOUGLAS; GOWER, 2007; GOWER, 2008; THULA et al., 2011). A seguir são estruturados alguns exemplos de estudos que utilizaram peptídeos biomiméticos na biomineralização do complexo amelo-dentinário.

TEA - Projeção de clusters de fosfato de cálcio amorfo (cACP) que são estabilizados por pequenas moléculas orgânicas removíveis. Esse estudo focou em fazer aglomerados de íons de fosfato de cálcio para produzir uma camada precursora para induzir o crescimento de cristal epitaxial de apatita do esmalte, biomimetizando a fronteira amorfa-cristalina de biomineralização tecidual in natura. Assim, foi utilizado a trietilamina (TEA) como um estabilizador eficaz de cACP e sua remoção controlável pode resultar na formação de HA pura (SHAO et al., 2019)

EMPs biomiméticos - Nesse estudo, foi proposto a regenerar tecidual de esmalte através da construção de um microambiente usando proteínas da matriz biomimética do esmalte (EMPs biomiméticos). Esses EMPs são compostos de peptídeo de amelogenina

rica em leucina modificado (mLRAP) e análogo de não amelogenina (NAA). O esmalte regenerado nessas EMPs biomiméticas, na superfície do tecido esmalte, produziu estruturas prismáticas e mostrou propriedades mecânicas semelhantes ao esmalte natural. (FANG et al., 2021)

ELR - Esse estudo aborda o processo de biomineralização mediado pela interação de ordem desordem usando recombinâmeros semelhantes à elastina (ELR). Foram usadas tecnologias recombinantes para projetar uma matriz supramolecular que é baseada em uma molécula que compreende regiões desordenadas intrinsecamente e domínios carregados negativamente. A principal molécula utilizada é um ELR que consiste em uma estrutura hidrofóbica principal (VPGIG), um segmento carregado positivamente (VPGKG) com o aminoácido lisina (K) para a reticulação de ELR e o análogo derivado de estaterina altamente ácido DDDEEKFLRRIGRFG (SNA15). (ELSHARKAWY et al., 2018)

PPi + LRAP - Esse estudo mostra uma nova abordagem biomimética para a regeneração do esmalte humano. A abordagem combina o uso de pirofosfato inorgânico (PPi) para controlar o início e a taxa de biomineralização do esmalte e o uso de peptídeo de amelogenina rico em leucina (LRAP), um produto alternativo não fosforilado de 56 aminoácidos de amelogenina para regular a forma e orientação dos cristais de esmalte em crescimento. Assim, esse estudo se baseia em descobertas anteriores que mostram que o LRAP pode, efetivamente, guiar a formação de matrizes ordenadas de cristais de HA em forma de agulha in vitro e no seu papel conhecido de inibidores de mineralização, como PPi, desempenham na regulação da formação de tecido mineralizado. (KWAK et al.,)

Asp + PAA - Esse estudo teve como objetivo investigar a remineralização biomimética da dentina desmineralizada pelo ácido aspártico (Asp), que é abundante em proteínas não colágenas. O Asp foi adicionado a uma solução mineralizante contendo ácido poliacrílico (PAA) para explorar o mecanismo do Asp que regula o processo de transição de fase de fosfato de cálcio amorfo puro (ACP). Asp promoveu a cinética de cristalização do fosfato de cálcio amorfo estabilizado com PAA em HA e encurtou o tempo de remineralização da dentina desmineralizada de 7 para 2 dias. A dentina remineralizada recém-formada tinha morfologia e estabilidade biológica semelhantes à camada de dentina natural. (SHAO et al., 2021)

Peptídeo DPP biomimético - Esse estudo demonstra um sistema de nanofibras de peptídeo responsivo a enzimas, induzindo a biomineralização. Ele biomimetiza as propriedades estruturais e funcionais da fosfoproteína dentinária (DPP) e facilita a deposição de minerais semelhantes à apatita. As moléculas do peptídeo mimético de DPP se automontam por meio da desfosforilação pela fosfatase alcalina (ALP), uma enzima que

participa da mineralização da matriz dentária e óssea. A formação da rede de nanofibras também é induzida pela adição de íons de cálcio. O processo de gelificação após a formação de nanofibras produz uma matriz extracelular mineralizada como o material, onde as propriedades do scaffold e dos grupos de fosfato promovem a mineralização. (GULSEREN et al., 2019)

Peptídeo P5 - Esse estudo fez simulações de dinâmica molecular atomística para rastrear domínios de ligação selecionados de DPP em HA. A partir desses resultados, selecionaram um peptídeo funcionalmente relevante, Ace-SSDSSDSSDSSDSSD-NH₂ (denominado P5) e sua forma fosforilada (denominada P5P). Em solução, P5 inibiu o crescimento de cristais de HA, enquanto em concentrações semelhantes, P5P o estimulou. Essas descobertas sugerem que a fosforilação controla a formação transitória da estrutura secundária e terciária dos peptídeos da DPP e, muito, provavelmente, da própria DPP, que por sua vez controla o crescimento de HA em solução e possivelmente o crescimento de HA em tecidos mineralizados. (VILLARREAL-RAMIREZ et al.,)

Peptídeo - Alguns estudos propõem a mineralização de tecidos após dano físico ou desmineralização usando ácidos polianiônicos no lugar de NCPs, mas os tecidos remineralizados falham em recuperar, totalmente, suas propriedades mecânicas. Esse estudo foca em um pré-tratamento com certos peptídeos anfífilos (uma classe de polímeros semelhantes a peptídeos que consiste em glicinas N-substituídas que têm sequências monoméricas definidas) que aumenta a ordenação e mineralização do colágeno e induz a remineralização funcional das lesões dentinárias in vitro. Nos túbulos de dentina, os nanocristais de apatita recém-formados são coalinhados com o eixo C-terminal paralelo à periferia tubular, e a recuperação da ultraestrutura do tecido é acompanhada pelo desenvolvimento de alta resistência mecânica. (CHIEN et al., 2017)

CMC/ACP - Foi feita uma solução do nanocomplexo mediado por peptídeo quimérico de carboximetilquitosana/fosfato de cálcio amorfo (CMC/ACP). Os peptídeos quiméricos foram adicionados para orientar o arranjo das nanopartículas de ACP e para ligar as nanopartículas de ACP, especificamente, à superfície desmineralizada do esmalte. Esses Nanocomplexos CMC/ACP foram obtidos e puderam ser mantidos por muito tempo sem precipitação. Após a degradação do NaClO e orientação dos peptídeos quiméricos, as nanopartículas de ACP foram organizadas em arranjos orientados antes de se transformarem em cristais, e os cristais semelhantes ao esmalte foram fortemente ligados à superfície desmineralizada. Os cristais de esmalte recém-formados eram quase bem organizados e equipados com fortes propriedades mecânicas. (XIAO et al., 2017)

CMC/ACP - Esse estudo propôs a remineralização da dentina desmineralizada

em um modelo de dente de cárie profunda usando nanocomplexos de carboximetilquitosana / fosfato de cálcio amorfo (CMC/ACP) com base na simulação do efeito estabilizador da proteína 1 da matriz dentinária (DMP1) no ACP na biomineralização da dentina. Os resultados experimentais indicam que o CMC pode estabilizar ACP para formar nanocomplexos de CMC/ACP, que é capaz de ser processado em scaffolds por liofilização. No modelo de colágeno de camada única, as nanopartículas de ACP são liberadas de andaimes de nanocomplexos CMC/ACP dissolvidos e, em seguida, se infiltram nas fibrilas de colágeno através das zonas de lacuna (40 nm) para realizar a mineralização intrafibrilar do colágeno. (CHEN et al., 2015)

Hidrogel CS+A - Esse estudo apresenta o primeiro relatório sobre o uso simultâneo de quitosana (CS) e agarose (A) em um hidrogel à base de biopolímero para a remineralização biomimética de uma superfície de esmalte nativo condicionada com ácido durante a imersão de 4-10 dias em saliva artificial com ou sem flúor. (MUSAT et al., 2021)¹

Gel + MgHA + CS - Esse estudo mostra uma abordagem biomimética para projetar scaffolds híbridos semelhantes às características físico-químicas dos tecidos mineralizados naturais. A ideia consiste na nucleação de nanocristais de HA dopada com magnésio (MgHA) na matriz de gelatina (Gel) gerando flocos híbridos (Gel/MgHA) caracterizados por uma relação de peso Gel: MgHA próxima a 20:80 e tamanho de 50-70 m. Restrições químicas e topotáticas afetam a formação da fase mineral de MgHA no molde orgânico, gerando MgHA quase amorfo. O Gel/MgHA foi então agregado na mistura polimérica feita de quitosana (CS) e Gel para obter uma estrutura porosa 3D com polímeros: proporção em peso de MgHA de 40: 60 e caracterizado por uma estrutura porosa alinhada conforme obtida por processo de liofilização controlado. (CAMPODONI et al., 2020)

Nesse sentido, alguns peptídeos biomiméticos foram projetados para uma interação específica com a HA, esses podem ser descritos como Peptídeos de Ligação a Hidroxiapatita (HBP), assim como para interação com fosfatos de cálcio amorfos. Contudo, ambos idealizam a formação de HA e biomimetizam a função das proteínas da matriz dos tecidos amelodentinários. Isso corresponde ao papel das amelogeninas e das proteínas não colagenosas (GUNGORMUS et al., 2008; ZHAO et al., 2016).

Um grupo de pesquisadores elaboraram uma sequência de cinco peptídeos análogos biomiméticos HBP que se estabelecem mimetizando o papel das proteínas da matriz de esmalte e das proteínas não colagenosas (GUNGORMUS et al., 2008). A partir disso, um outro grupo buscou analisar o potencial do número de aminoácidos fosforilados e carga desses aminoácidos para induzir a biomineralização na HA, e dentre esses peptídeos se destaca o HBP pVTK com a sequência de aminoácidos correspondente a Val-Thr-Lys-

His-Leu-Asn-Gln-Ile-pSer-Gln-pSer-Tyr, com pureza > 98% e com quatro aminoácidos fosforilados e com carga negativa e um com carga positiva e não fosforilados, tendo como produto mineral nanopartículas esféricas (LING et al., 2020).

O uso do HBP se deu por meio do preparo de uma solução mineralizadora, a partir de uma massa apropriada de pVTK uma concentração de 0,4 mM do peptídeo em tampão fosfato 0,1 mM (*pH* 7,4). Em seguida, foi preparada uma solução mineralizante de $CaCl_2$ (25mM) com 0,4mM pVTK e $(NH_4)_2HPO_4$ (15mM) foram preparadas em tampão HEPES 0,1mM (*pH* 7,4) em tubos de plástico. A reação foi realizada adicionando, lentamente, a solução de $(NH_4)_2HPO_4$ (15mM) à solução de $CaCl_2$ (25mM). A partir de 1h a 4h se obteve a presença de uma fase de transição amorfa e somente após 1 dia foi observado presença de cristais de HA (LING et al., 2020).

O mesmo grupo de pesquisadores idealizaram o HBP, elaboraram outra sequência de cinco peptídeos análogos biomiméticos com aminoácidos com cargas opostas para acelerar o processo de biomineralização de fosfatos de cálcio (GUNGORMUS; TULUMBACI, 2021). Sendo assim, a partir desse resultado foi destacado um análogo biomimético designado como Peptídeo Promotor de Mineralização 3 (MPP3) formado pelos aminoácidos Pro-Gli-Fen-Lis-Ala-Asp-Arg-Ala-Fen-Lis-Ala-Asp-Arg-Ala (quatro aminoácidos com carga positiva e quatro com carga negativa) com pureza > 98% que possuía como produto mineral a formação de esferulitas + partículas em forma de agulha (GUNGORMUS et al., 2020).

A funcionalização com o peptídeo MPP3 consistia no preparo de uma solução mineralizadora (MPP3 0,40mM em di-H₂O) e com aplicação em duas etapas. A primeira consiste em um tratamento de superfície do fosfato de cálcio com a solução de MPP3, propriamente dita, com, aproximadamente, 50 μ l (o suficiente para cobrir e embeber toda a superfície), por 1 min em uma câmara hidratada, e depois lavar com di-H₂O. Enquanto a segunda etapa se baseia na aplicação de uma solução de mineralização (48mM de $CaCl_2$ e 28,8mM Na_2HPO_4 em tampão Tris-HCL à *pH* 7,4). Assim, para evitar a precipitação de cálcio e fosfato quando misturados na solução, volumes iguais (25 μ l) de soluções 96mM de $CaCl_2$ e 57,6mM de Na_2HPO_4 foram aplicados nas superfícies. Desse modo, o MPP3 combinado com concentrações altas de cálcio e fosfato facilita a biomineralização de fosfatos de cálcio, isso em tempo útil de apenas 10min (GUNGORMUS et al., 2020; GUNGORMUS; TULUMBACI, 2021).

A partir disso, algumas considerações sobre esses achados podem ser observadas acerca de peptídeos análogos biomiméticos. A densidade de carga do peptídeo controla principalmente a afinidade de ligação à superfície, enquanto a estrutura secundária desempenha um papel menor (ZHAO et al., 2016).

A afinidade de ligação de HA está correlacionada com a inibição da transformação em HA cristalino e formação de partículas tipo placa em vez de partículas tipo agulha

(LING et al., 2020).

O MPP3 mostrou aumento significativo na cinética de biomineralização e resultou em partículas semelhantes a agulhas em vez de partículas semelhantes a placas. Quando essas descobertas são consideradas, pode-se deduzir que MPP3 não tem uma forte afinidade para HA e que as diferenças morfológicas observadas nos minerais podem ser o resultado de um efeito cinético em vez de interação específica da face do peptídeo com o mineral (GUNGORMUS et al., 2008).

Os modelos de HBP possuem resíduos de cadeia lateral de aminoácidos, principalmente, hidrofílicos, dos quais lisina, ácido glutâmico e fosfoserina são carregados, enquanto asparagina e serina são resíduos de aminoácidos neutros polares. Todos esses aminoácidos podem interagir com os íons cálcio, fosfato e hidróxidos na superfície do HA por meio de interações eletrostáticas ou ligação hidrogênio (LING et al., 2020).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Descrição Geral

Neste trabalho, pastilhas de CaP foram utilizadas com o intuito de mimetizar os tecidos amelodentinários. Para isso, em um primeiro momento, foi realizada a síntese de CaP pelo método de precipitação aquosa seguida de prensagem e sinterização dos pós em pastilhas. Em um segundo momento, uma solução mineralizadora com um peptídeo análogo biomimético foi preparada para associação sobre as pastilhas de CaP, e caracterizadas físico-quimicamente. Por fim, foi realizado um teste de bioatividade, em meio de cultura McCoy, e teste de citotoxicidade indireta, avaliando assim a biomineralização e viabilidade celular, respectivamente, das pastilhas de CaP com o peptídeo associado, em comparação as pastilhas de CaP.

4.2 Síntese de Pastilhas de Fosfato de Cálcio

A síntese de CaP consistiu em uma rota de precipitação por via aquosa com controle de *pH* em temperatura ambiente (SILVA; ROCHA, 2011; NEVES et al., 2021). Assim, foi estabelecido o preparo de uma solução precursora com a mistura, sob agitação magnética, de 0,5Mol/L de $[Ca(OH)_2]$ (Isofar - Rio de Janeiro, Brasil), de uma solução de 1Mol/L de $[C_3H_6O_3]$ (Isofar - Rio de Janeiro, Brasil) e 0,3Mol/L de $[H_3PO_4]$ (Isofar - Rio de Janeiro, Brasil). A precipitação do CaP foi obtida a partir da adição de uma solução de 1Mol/L de hidróxido de potássio [KOH] para promover o ajuste do *pH* da solução. Toda a solução foi filtrada, posteriormente, por meio de um filtro de papel e uma bomba a vácuo acoplada em um erlenmeyer com saída lateral. Logo em seguida, o conteúdo filtrado da solução foi colocado na estufa a 80°C para secagem por 24h. Assim, a partir do material já seco, a amostra foi macerada em um almofariz e peneirada com uma peneira (marca +GF+ tipo PSA) com abertura de 355 μ m (42 mesh). A prensagem foi feita com 0,1g de pó de CaP, com carga uniaxial utilizando uma prensa SKAY (Tabela 7) e, em seguida, foram sinterizadas com uma taxa de aquecimento de 3°C/min até 1000°C e em seguida mantido um patamar de sinterização, nessa temperatura, por 1 hora. Ao final, pastilhas foram confeccionadas com, aproximadamente, 10mm de diâmetro.

Tabela 7 – Carga Axial utilizada para Prensagem

Equação	Descrição	Dados	Conversão
$\sigma = \frac{F}{A}$	$[\sigma]$ = tensão em MPa	$[A] = \pi \cdot r^2$	$[F] = Q \cdot a$
	$[F]$ = força em Newton	$[r]$ = raio de 5mm	$[1\text{MPa}] = 1\text{N/mm}^2$
	$[A]$ = área em milímetros	$[\sigma] = 100\text{MPa}$	$[1\text{Pa}] = 1\text{N/m}^2$
	$[Q]$ = carga em kgf	$[a] = \text{gravidade } (9,8\text{m/s}^2)$	
$[Q] = 801,4\text{kgf} = 0,8 \text{ Toneladas}$			

4.3 Peptídeo de Ligação a Hidroxiapatita

Os HBP são análogos biomiméticos que se estabelecem mimetizando o papel das proteínas da matriz de esmalte (amelogeninas) e das proteínas não colagenosas (SIBLING). Dessa forma, o HBP pode regular a nucleação e crescimento de partículas de CaP, assim como a fase de transição para HA.

Assim, uma sequência desses peptídeos modificados foi selecionada para esse estudo (pVTK), devido a sua composição, carga, afinidade por fosfatos de cálcio, como a HA, e capacidade de nucleação e crescimento de cristais (LING et al., 2020). A Tabela 8 apresenta características do peptídeo.

Tabela 8 – Propriedades do Peptídeo de Ligação à Hidroxiapatita

Peptídeo	Sequência	Carga ao <i>pH</i> 7	Números de Cadeias Polares		
			Ácido	Básico	Neutro
pVTK	VTKHLNQIS _p QS _p Y	-3	4: pSer (2)	1: Lys	7: Tyr (1), Thr (1), Asn (1), Gln (2), Val (1), His (1).
Massa molar: 1.577,53					
Aminoácidos: Val-Thr-Lys-His-Leu-Asn-Gln-Ile-pSer-Gln-pSer-Tyr					
Produto Mineral: nanopartículas esféricas					

Para a reconstituição do peptídeo foi realizado, em primeiro momento, o preparo de uma solução tampão de fosfato a *pH* de 7,4 (*Phosphate Buffered Saline* - PBS) Gibco™). Dessa forma, foi utilizado a proporção de 9,6g de PBS para 1L de água destilada para formar uma solução a 1Mol de PBS. Em seguida, para a reconstituição foi idealizado uma concentração de 0,4mM do peptídeo HBP (pVTK) (Tabela 9) (LING et al., 2020).

Resumidamente, 62,1mL de PBS foram utilizados para reconstituir o peptídeo e, em seguida, aplicada uma quantidade de 50 μ l na superfície das pastilhas de CaP, de modo a recobrir, totalmente, a superfície. Posteriormente, as pastilhas secaram a temperatura ambiente.

Tabela 9 – Solução do Peptídeo de Ligação à Hidroxiapatita

Equação	Descrição	pVTK
$Q_M = MM \cdot Q_{Mol} \cdot \frac{1}{d} \cdot \frac{1}{pureza}$	$[Q_M]$ = quantidade do material $[MM]$ = massa molar em g/mol $[Q_{Mol}]$ = quantidade do material em mol $[d]$ = densidade em kg/L ou g/ml $[pureza] = 1$	[VTKHLNQISpQSpY] $[MM] = 1.577,53\text{g/mol}$ $[Q_{Mol}] = 0,004\text{mol}$ $[pureza] = 98\%$ Quantidade 1L = 0,06438g/mol

Legenda: a densidade foi desconsiderada para esse material, logo foi considerado como 1.

4.4 Caracterização Físico-Química das Amostras

4.4.1 Difração de Raios X

As pastilhas de CaP foram analisadas, quanto a sua fase, por Difração de Raios X (DRX) no Laboratório de Difração de Raios X do Instituto Militar de Engenharia (IME) com um difratômetro de modelo MRD X' Pert PRO (PANalytical) com fonte de $\text{CoK}\alpha$ ($\lambda=1,789 \text{ \AA}$), corrente de 40mA e 40 kV, varredura de 10° a $90^\circ 2\theta$ e um passo de coleta de $0,03^\circ$. Além disso, o tamanho do cristalito foi calculado pela equação de Scherrer (Tabela 10) modificada (MONSHI; FOROUGH; MOUSHI, 2012).

Tabela 10 – Equação de Scherrer

Equação	Descrição
$D = \frac{K\lambda}{(\beta \cdot \cos\theta)}$	$[D]$ = tamanho médio do cristalito $[K]$ = fator de forma (0,94) $[\lambda]$ = comprimento de onda da DRX ($\lambda = 1,789 \text{ \AA}$) $[\beta]$ = largura a meia altura do pico de difração $[\cos\theta]$ = ângulo de difração

A equação de Scherrer modificada, utiliza a técnica dos mínimos quadrados para diminuir os erros. Assim, esse método se baseia na utilização do logaritmo neperiano (\ln), nos fatores da fórmula que não são constantes, e a partir disso, fazer plotagem de um gráfico de dispersão. Nesse sentido, é considerado o $[\ln\beta]$ contra $[\ln(1/\cos\theta)]$, obtendo a intercepção de uma regressão linear dos mínimos quadrados, ou seja, uma equação do primeiro grau, no formato, $y = ax + b$, no qual b = interseção no eixo y . Isso para que se consiga obter um único valor de $[D]$ para todos os picos disponíveis (equação 8).

$$\ln\beta = \ln\frac{1}{\cos\theta} + \ln\frac{K\lambda}{D} \quad (8)$$

4.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A identificação dos grupos funcionais das amostras foi realizada pela Espectroscopia Infravermelho de Transformada de Fourier (FTIR) no Departamento de Engenharia

Química do IME. A caracterização foi realizada utilizando um espectrômetro Perkin Elmer (Spectrum 100) com um acessório atenuado de reflectância total (ATR Universal), na gama de números de onda de 650-4000 cm^{-1} . Uma amostra foi colocada sobre o cristal diamante/ZnSe. Os espectros foram recolhidos como resultado de 4 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas à temperatura ambiente.

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo

A caracterização morfológica da superfície das pastilhas de CaP foi realizada utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG) (Field Emission Gun FEI Quanta FEG 250, Hilesboro, Oregon USA), Zeiss DSM 940 do Laboratório de Microscopia e Microanálise Eletrônica do IME. Os parâmetros de caracterização foram estabelecidos a uma tensão de 10kV e a uma distância média de trabalho de 10mm.

4.5 Caracterização Biológica *in vitro* das Amostras

4.5.1 Teste de Bioatividade em Meio de Cultura McCoy

O meio de cultura McCoy é um meio simulador de fluido corporal (Tabela 11) que tem a capacidade de promover a precipitação de partículas de *bone like apatite* em superfícies bioativas, isso em condições específicas de *pH*, temperatura e pressão de CO_2 (FERREIRA et al., 2017).

Tabela 11 – Composição do Meio de Cultura de McCoy

Aminoácidos (mg/L)		Vitaminas (mg/L)		Saís Inorgânicos (mg/L)		Outros Componentes (mg/L)	
Glicina	7,50	Ácido Ascórbico	0,50	CaCl_2 (anhyd.)	100,00	Bacto-Peptona	-
L-Alanina	13,90	Biotina	0,20	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200,00	Glicose (Dextrose)	3.000,00
L-Arginina • HCL	42,10	Cloreto de Colina	5,00	KCl	400,00	Glutathione (reduzida)	0,50
L-Aspargina	45,00	D-Ca Pantotenato	0,20	NaHCO_3	2.200,00	HEPES	5.958,00
L-Ácido Aspartico	19,97	Ácido Fólico	10,00	NaCl	5.100,00	Vermelho de Fenol	10,00
L-Cistina	31,50	Nicotinamida	0,50	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	580,00		
L-Ácido Glutâmico	22,10	Ácido Nicotínico	0,50				
L-Glutamina	219,20	Ácido p-aminobenzóico	1,00				
L-Histidina HCl • H_2O	20,96	Piridoxal HCl	0,50				
L-Hidroxiprolina	19,70	Piridoxina HCl	0,50				
L-Isoleucina	39,36	Riboflavina	0,20				
L-Leucina	39,36	Tiamina HCl	0,20				
L-Lisina • HCl	36,50	Vitamina B12	2,00				
L-Metionina	19,90	i-Inositol	36,00				
L-Fenilalanina	16,50						
L-Prolina	17,30						
L-Serina	26,30						
L-Treonina	17,90						
L-Triptofano	3,10						
L-Tirosina • 2Na • $2\text{H}_2\text{O}$	26,20						
L-Valina	17,60						

Assim, para o teste de análise de bioatividade, as pastilhas de CaP foram divididas em 4 grupos (Tabela 12): pastilhas de CaP sem o peptídeo, pastilhas de CaP com o peptídeo, pastilhas de CaP em meio PBS, e pastilha de alumina [Al_2O_3] como material bioinerte para controle negativo. Além disso, todas as pastilhas foram analisadas no DRX, FTIR e MEV-FEG antes e após o ensaio de bioatividade.

Tabela 12 – Grupos Estabelecidos para o Teste de Bioatividade

Pastilha	Representação	Condição	Período
CaP sem o peptídeo	CaP	Controle positivo (sem precipitação)	2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 12h, 24h, 48, 72h, 168h, e 336h
CaP com o peptídeo	$CaP_{Peptideo}$	Experimental	
CaP em meio PBS	CaP_{PBS}	Controle positivo (com precipitação)	
Pastilha de [Al_2O_3]	Alumina	Controle negativo	

Os testes de bioatividade foram realizados no Departamento de Bioengenharia do R-Crio Células Tronco em Campinas, São Paulo. As pastilhas foram colocadas em frascos de plástico (tipo *falcon*) com tampas seladas contendo 20mL de solução de McCoy de acordo com a norma ISO 23317 (ABNT, 2017). Esses frascos foram mantidos à temperatura ambiente e permaneceram por períodos de 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 12h, 24h (1 dia), 48 (2 dias), 72h (3 dias), 168h (7 dias), e 336h (14 dias) (Tabela 12). As amostras foram retiradas após os respectivos períodos, cuidadosamente, lavadas com água destilada e colocadas a secar na estufa, a temperatura ambiente, para posterior caracterização.

4.5.2 Teste de Citotoxicidade Indireta

O ensaio de citotoxicidade consiste em um teste biológico (direto ou indireto) que tem como finalidade avaliar a toxicidade de biomateriais em meios de cultura celular. Para esses testes são utilizados corantes vitais (produto de sais solúveis em água) que são metabolizados por células. A partir disso as células que são viáveis conseguem metabolizar esses sais (colorindo o meio com o corante) e as que não são viáveis não conseguem. Dessa forma, ao realizar esse teste se pode concluir a biocompatibilidade e viabilidade celular dos biomateriais (ROGERO et al., 2003).

As células tronco mesenquimais de polpa dentária (Lonza, PT-5025) foram cultivadas em frasco de cultura de células de 25cm² usando o *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich), 1% de antimicrobianos (100ui/ml de penicilina, 100μg/ml de estreptomicina) (Sigma-Aldrich), 2mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 100μM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas em uma atmosfera umidificada com 5% de CO_2 a 37°C, com

substituição do meio de cultura a cada 2 dias. As células foram separadas usando a enzima TrypLETM Express (1x) (GibcoTM) a 37°C durante 13min com, aproximadamente, 80% de confluência (SANTOS; SOARES; FILHO, 2009). A seguir, imediatamente, foram semeadas a uma densidade de células de 10^4 células em uma placa de cultura de 96 poços, obtendo o volume final de $100\mu\text{L}$ /poço.

Assim, foram considerados três grupos para o teste de viabilidade celular: CaP (pastilhas de CaP sem o peptídeo), $CaP_{Peptideo}$ (pastilhas de CaP com peptídeo), e Controle. Essas pastilhas foram, também, incubadas em DMEM a uma atmosfera úmida de 95% de ar e 5% de CO_2 a 37°C, em uma placa de 12 poços. Além disso, o ensaio de citotoxicidade foi realizado em triplicata ($n = 3$).

Após um período de incubação de 24h, $100\mu\text{L}$ do meio de cultura dos grupos CaP, Peptídeo e Controle foram transferidos para a placa de cultura de 96 poços. Os ensaios foram realizados nos períodos de 24h e 48h. Após esses períodos, foi adicionado $10\mu\text{L}$ de solução WST-1 (Roche) em cada poço e as células foram incubadas a 37°C em 5% de CO_2 durante 4h. Após este período, os espécimes foram agitados, suavemente, durante 1min e a absorbância foi medida a 450nm por um leitor de microplacas (Promega, Glomax E8032) nos períodos de 24h e 48h.

Foi utilizado o ensaio de cultura colorimétrico, no qual o meio de cultura contendo WST-1 sem células foi utilizado para definir o limiar de fundo, enquanto o meio de cultura contendo WST-1 com células foi utilizado como controle. Isso de acordo com a seguinte equação 9:

$$VC(\%) = \frac{AC - CN}{CP - CN} \times 100 \quad (9)$$

No qual [VC] é correspondente à Viabilidade celular; [AC] à absorbância celular; [CP] ao controle positivo; e o [CN] ao controle negativo.

A análise de dados foi realizada com o software GraphPad Prism (Versão 5.00, GraphPad Software Inc. San Diego, Califórnia). A interação entre parâmetros independentes foi explorada. O significado estatístico foi definido para $p < 0,05$. Os testes de viabilidade celular foram realizados no Departamento de Bioengenharia do R-Crio Células Tronco em Campinas, São Paulo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Descrição Geral

A sequência de exposição dos resultados se estrutura a partir da caracterização das pastilhas de CaP pós síntese, seguido pelos resultados do teste de bioatividade, caracterizações físico-químicas e citotoxicidade indireta.

5.2 Caracterização das Pastilhas de Fosfato de Cálcio

Nesse tópico são apresentados os resultados respectivos às técnicas de caracterização de DRX e FTIR, e análise da morfologia pelo MEV-FEG das pastilhas de CaP (ainda não submetidos ao teste de bioatividade). O CaP foi sintetizado pela rota de precipitação aquosa por via úmida, e em seguida foi processado, prensado em pastilhas, gerando uma pastilha verde amorfa (CaP_{Verde}) e, posteriormente, sinterizada à 1000°C ($CaP_{Sinterizada}$).

A partir do difratograma da CaP_{Verde} é possível observar a presença de picos poucos definidos e halos amorfos (bases largas), indicando fases com baixa cristalinidade. O contrário pode ser visto na $CaP_{Sinterizada}$, na qual existe presença de picos bem definidos, maior intensidade (contagem por segundo), e menor *background* (bases mais estreitas), indicando fases com maior cristalinidade. Enquanto que para as pastilhas CaP_{Verde} , foi evidenciada a presença de brushita (ficha JCPDS 01-072-0713), para as pastilhas $CaP_{Sinterizada}$, as fases de HA e Fosfato Tricálcico (TCP) foram identificadas utilizando as fichas JCPDS 00-009-0432 e JCPDS 00-009-0169, respectivamente (Figura 23).

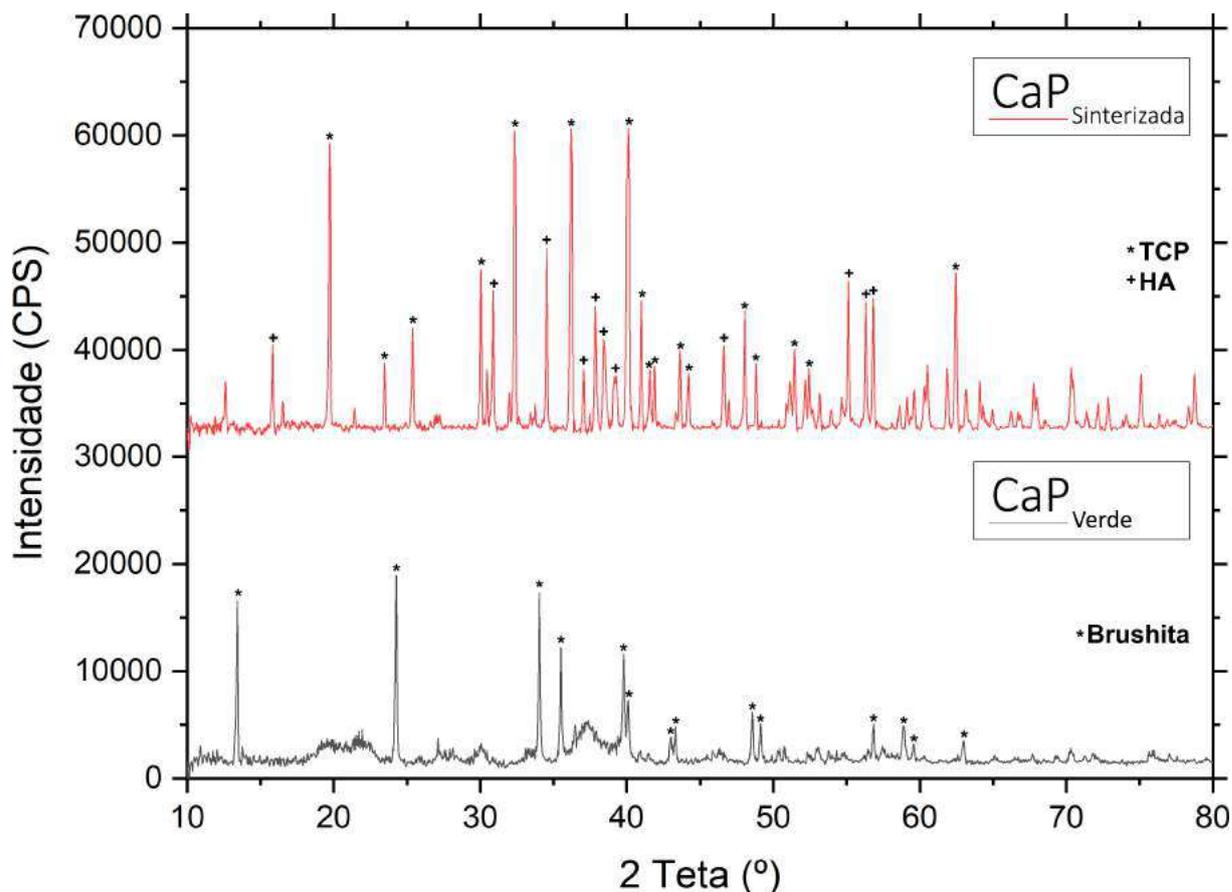


Figura 23 – Difratoograma das Pastilhas de Fosfato de Cálcio Verde e Sinterizado.

Em seguida, utilizou-se a equação de Scherrer modificada para calcular o tamanho de cristalito dessas duas amostras (MONSHI; FOROUGH; MOUSHI, 2012). A grande vantagem desse método é a possibilidade de diminuir os padrões de erro, como, por exemplo, a magnificação do tamanho do cristalito, independentemente, das variâncias da equação de Scherrer. Isso se justifica uma vez que, com o aumento do cosseno de teta $[\cos\theta]$ existe um aumento do tamanho de cristalito $[D]$, de modo que os picos com $2\theta = 180^\circ$ são 10 vezes maiores do que $2\theta = 10^\circ$ (MONSHI; FOROUGH; MOUSHI, 2012). Através da Figura 24 é possível identificar a CaP_{Verde} e $CaP_{Sinterizada}$, nos quais os resultados da aplicação desse método podem ser observados.

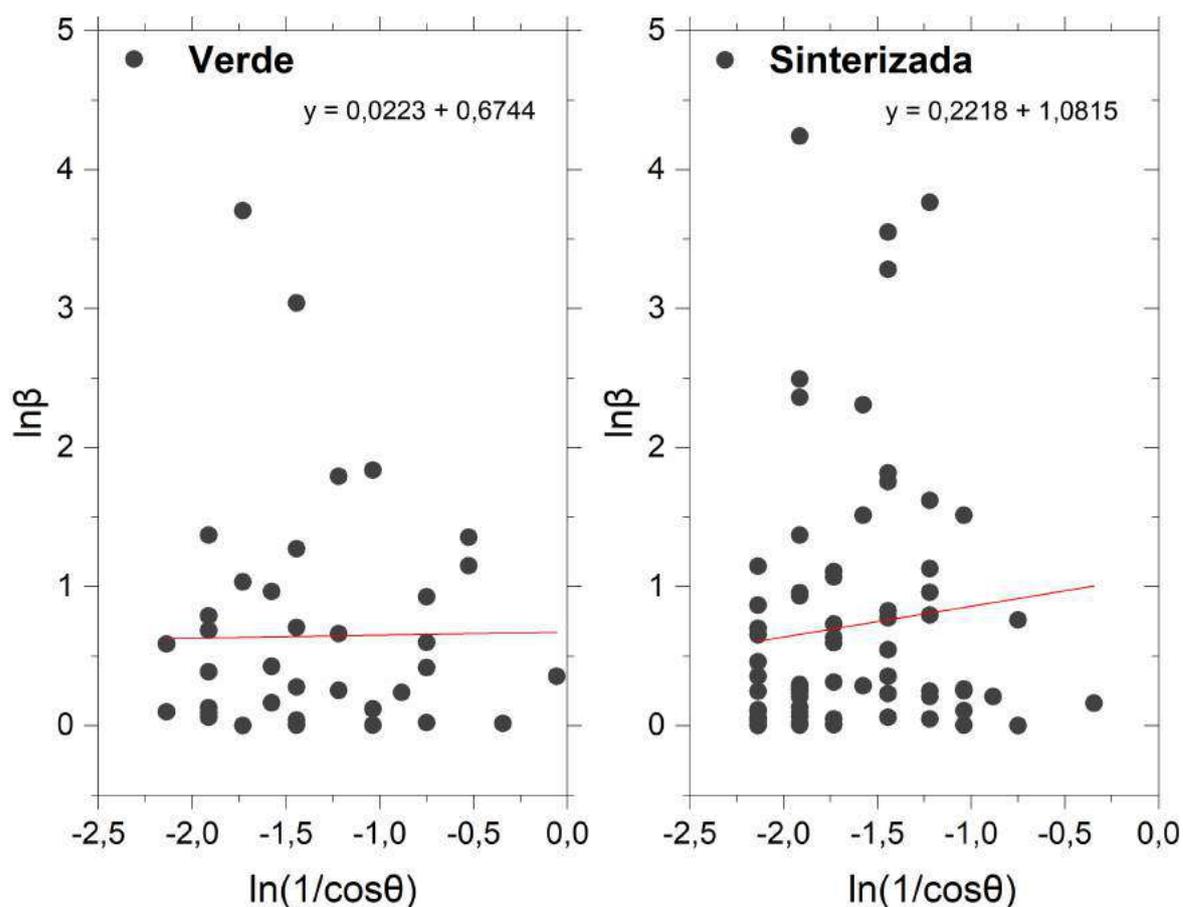


Figura 24 – Plotagem da Equação de Scherrer Modificada para Pastilhas de Fosfato de Cálcio Verde e Sinterizada.

A seguir, foi verificada a análise de grupamentos funcionais inorgânicos das pastilhas de CaP. A Figura 25 apresenta o FTIR da pastilha $CaP_{Sinterizada}$.

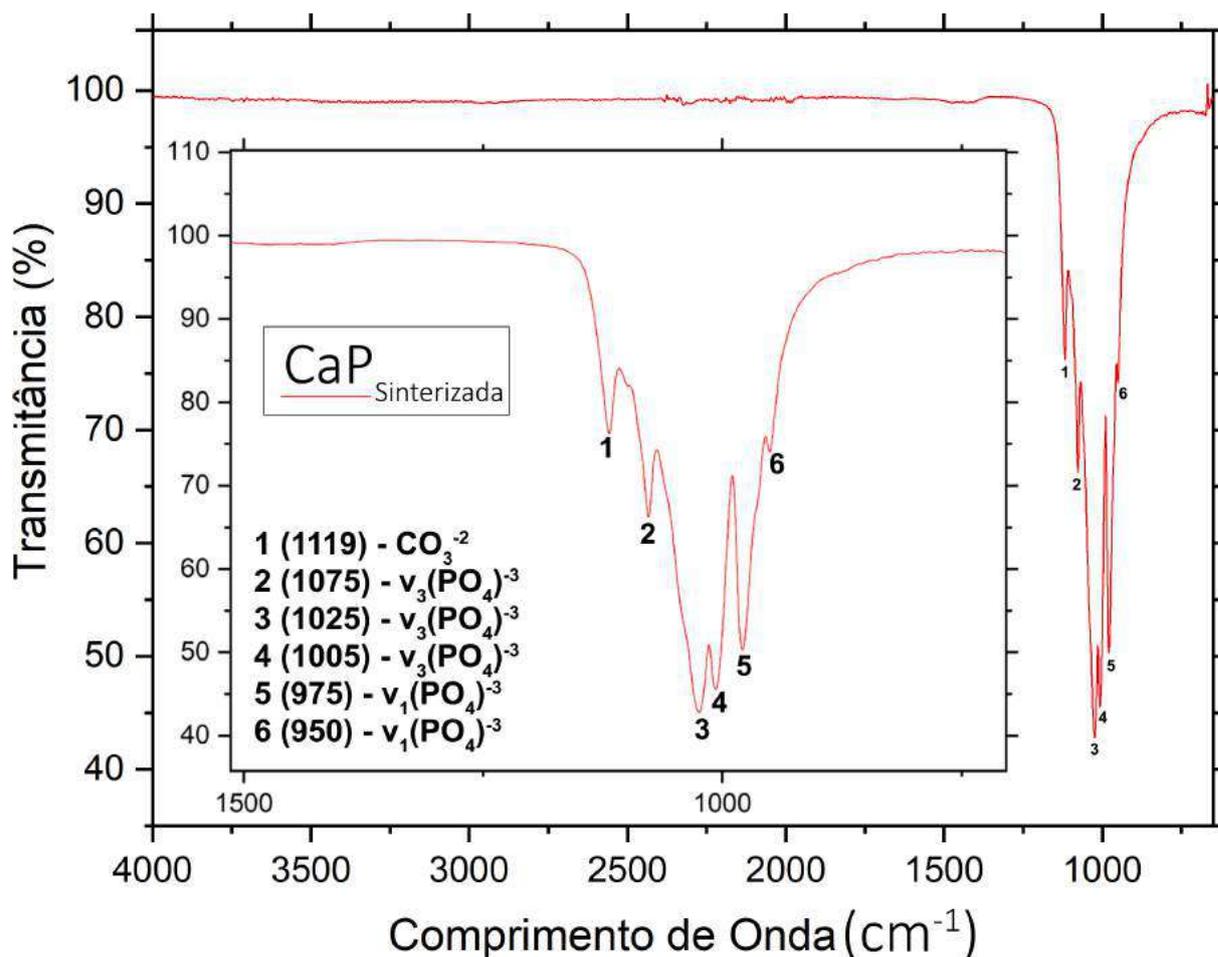


Figura 25 – Espectroscopia de Infravermelho de Transformada de Fourier da pastilha de Fosfato de Cálcio

No FTIR da $\text{CaP}_{\text{Sinterizada}}$ pode ser visto a banda 1118cm^{-1} referente aos grupos $[\text{CO}_3^{-2}]$ relativos a imperfeições cristalinas da HA não estequiométrica; e as bandas 1078cm^{-1} , 1022cm^{-1} e 1006cm^{-1} identificam o modo vibracional $\nu_3(\text{PO}_4)^{-3}$ (estimamente não simétrico degenerado); as bandas 977cm^{-1} e 949cm^{-1} identificam o modo de estiramento simétrico não degenerado $\nu_1(\text{PO}_4)^{-3}$.

A morfologia superficial das pastilhas de CaP foi analisada pelo MEV-FEG (Figura 26). É possível observar a presença de glóbulos esféricos bem delimitados com regiões com aspecto mais condensado que outras. Além disso, existem regiões globulares mais coalescidas em algumas áreas, mas de modo geral, a micrografia se apresenta com uma morfologia homogênea e linear.

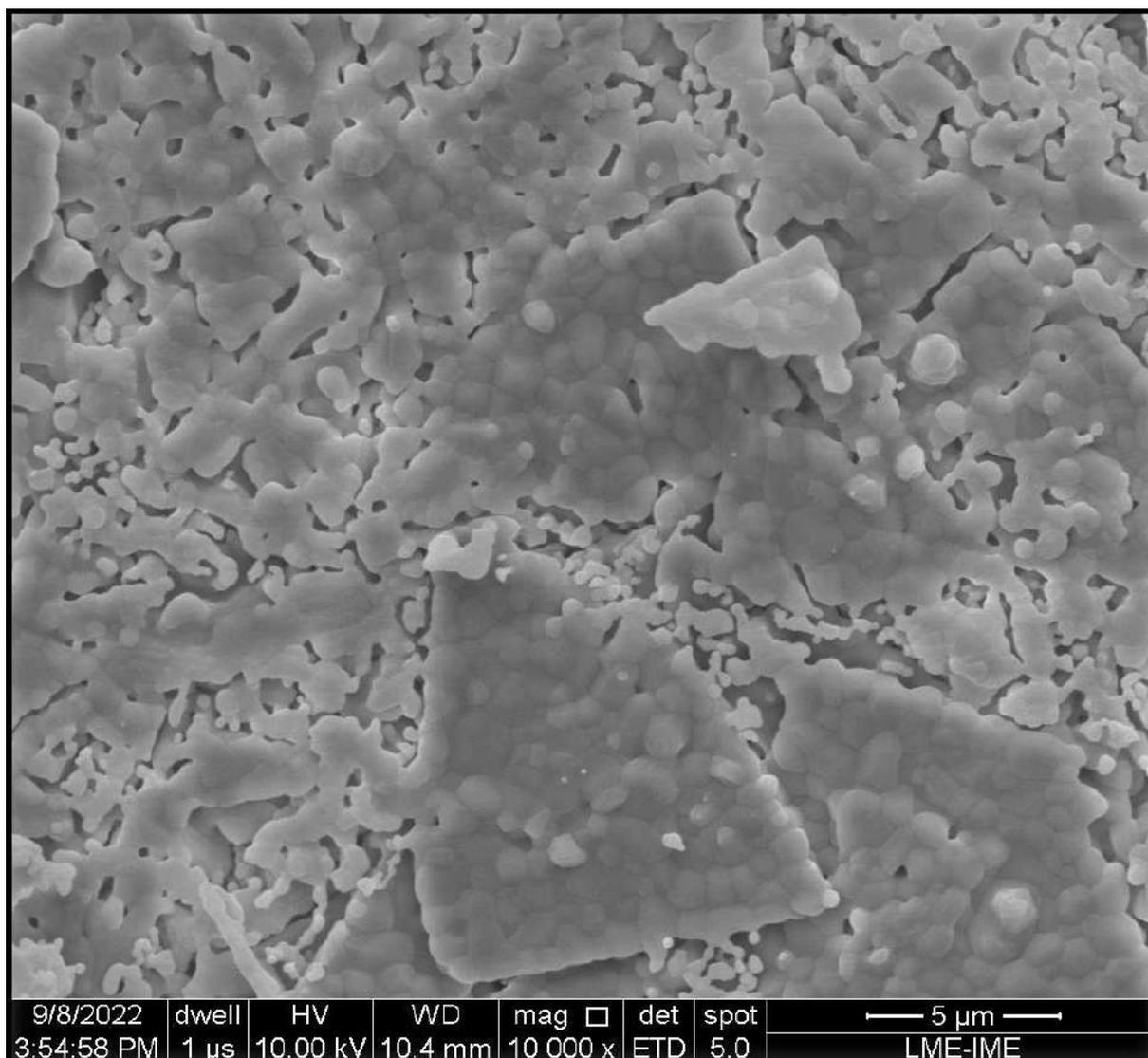


Figura 26 – Morfologia da Pastilha de Fosfato de Cálcio Sinterizada. Fotomicrografia de MEV-FEG

A partir desses resultados de DRX, FTIR e MEV-FEG se pode concluir que as pastilhas de $CaP_{Sinterizada}$ são pastilhas bifásicas compostas tanto por HA quanto por TCP, e possuem morfologia composta por glóbulos esféricos com algumas regiões mais coalescidas que outras. Além disso, para os ensaios biológicos foram utilizadas as pastilhas $CaP_{Sinterizada}$, que a partir desse momento da dissertação, serão nomeadas como CaP , $CaP_{Peptideo}$ e CaP_{PBS} .

5.3 Teste de Bioatividade em Meio de Cultura McCoy

O teste de bioatividade consiste na imersão de biomateriais em uma solução com Fluido Corporal Simulado (*Simulated Body Fluid* - SBF). Trata-se de uma solução

inorgânica com concentrações iônicas semelhantes ao plasma sanguíneo. Assim, o resultado positivo do teste de bioatividade se baseia na presença de precipitação de apatita semelhante à apatita óssea (*bone-like apatite*) na superfície do biomaterial (KOKUBO, 1990).

Nesse estudo, o teste de bioatividade foi realizado no meio de cultura McCoy, sendo as pastilhas bifásicas de HA/TCP sinterizadas a 1000°C (CaP , $CaP_{Peptideo}$ e CaP_{PBS}) e as pastilhas de Alumina (alumina com nióbia e hematita) (Tabela 13) consideradas para esse teste. Os períodos de tempo iniciais (2h a 12h) foram considerados como teste-piloto, e os tempos seguintes (24h a 336h) como o teste de bioatividade propriamente dito. Esses intervalos de tempo escolhidos para o teste de bioatividade são justificados uma vez que o potencial de biomineralização do peptídeo foi avaliado, pelo autor elaborador do peptídeo, em estado amorfo durante 10min, 30min e 1h; a observação, em 4h, de um estado de transição para HA; e aos 1, 2, e 6 dias a presença de HA foi identificada (LING et al., 2020).

Tabela 13 – Teste de Bioatividade em Meio McCoy

Grupo	Descrição	Expectativa
CaP (controle positivo)	Pastilhas de HA/TCP somente em meio de cultura McCoy	Presença ou ausência de precipitação espontânea, de grupamentos de carbonato apatita sobre a superfície dos materiais.
$CaP_{Peptideo}$ (experimental)	Pastilhas de HA/TCP funcionalizadas com peptídeo HBP reconstituído em PBS) em meio de cultura McCoy	
CaP_{PBS} (controle positivo)	Pastilhas de HA/TCP somente em PBS sem funcionalização e sem contato com o meio de cultura McCoy	
Alumina (controle negativo)	Pastilhas de Alumina somente em meio de cultura McCoy	

O grupo de Alumina consiste em pastilhas de alumina (romboédrica) com nióbia (monoclínica) e hematita (romboédrica). Essas pastilhas de alumina possuem 2% de nióbia em peso e hematita 0%, 0,5% 1% e 2%. Sendo assim, esse grupo foi utilizado como controle negativo, evidenciando em (a) Alumina com 2% de Nióbia e 0% de Hematita, (b) Alumina com 2% de Nióbia e 0,5% de Hematita, (c) Alumina com 2% de Nióbia e 1% de Hematita, e (d) Alumina com 2% de Nióbia e 2% de Hematita. Através da Figura 27 é possível observar os contornos de grãos com a presença de irregularidades, mas por ser um material bioinerte, confirma a ausência de precipitação superficial.

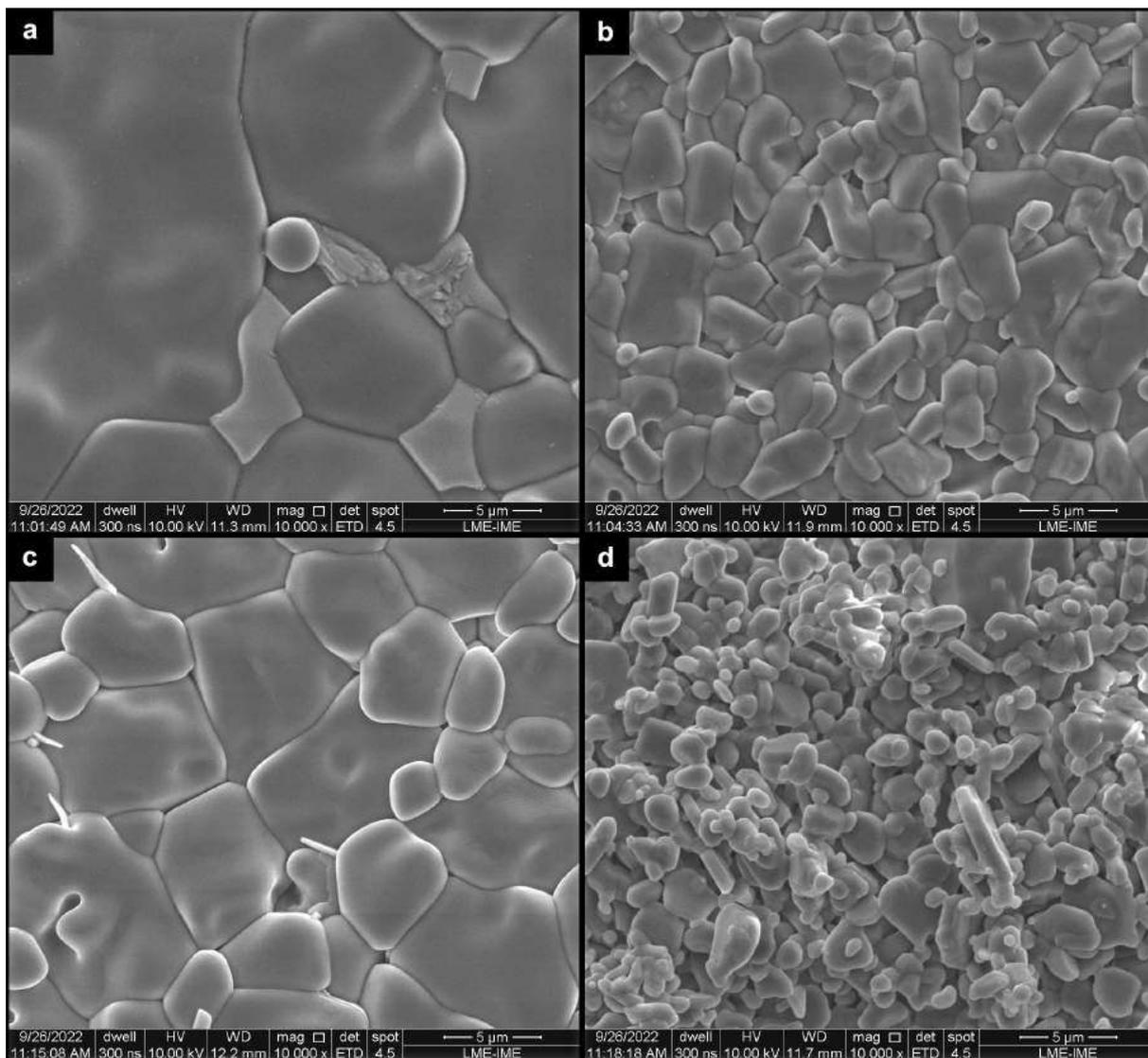


Figura 27 – Morfologia das Pastilhas de Alumina submetidas ao teste de Bioatividade. (a) 24h - 10.000x, (b) 48h - 10.000x, (c) 72h - 10.000x, (d) 168h - 10.000x.

As pastilhas do grupo *CaP* foram analisadas nos períodos de tempo 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e 12h como testes-piloto. Na Figura 28 em (a) 2h, (b) 3h, (c) 4h e (d) 5h é conservado o aspecto uniforme descrito, inicialmente, nas pastilhas de *CaP*_{Sinterizada} (Figura 26).

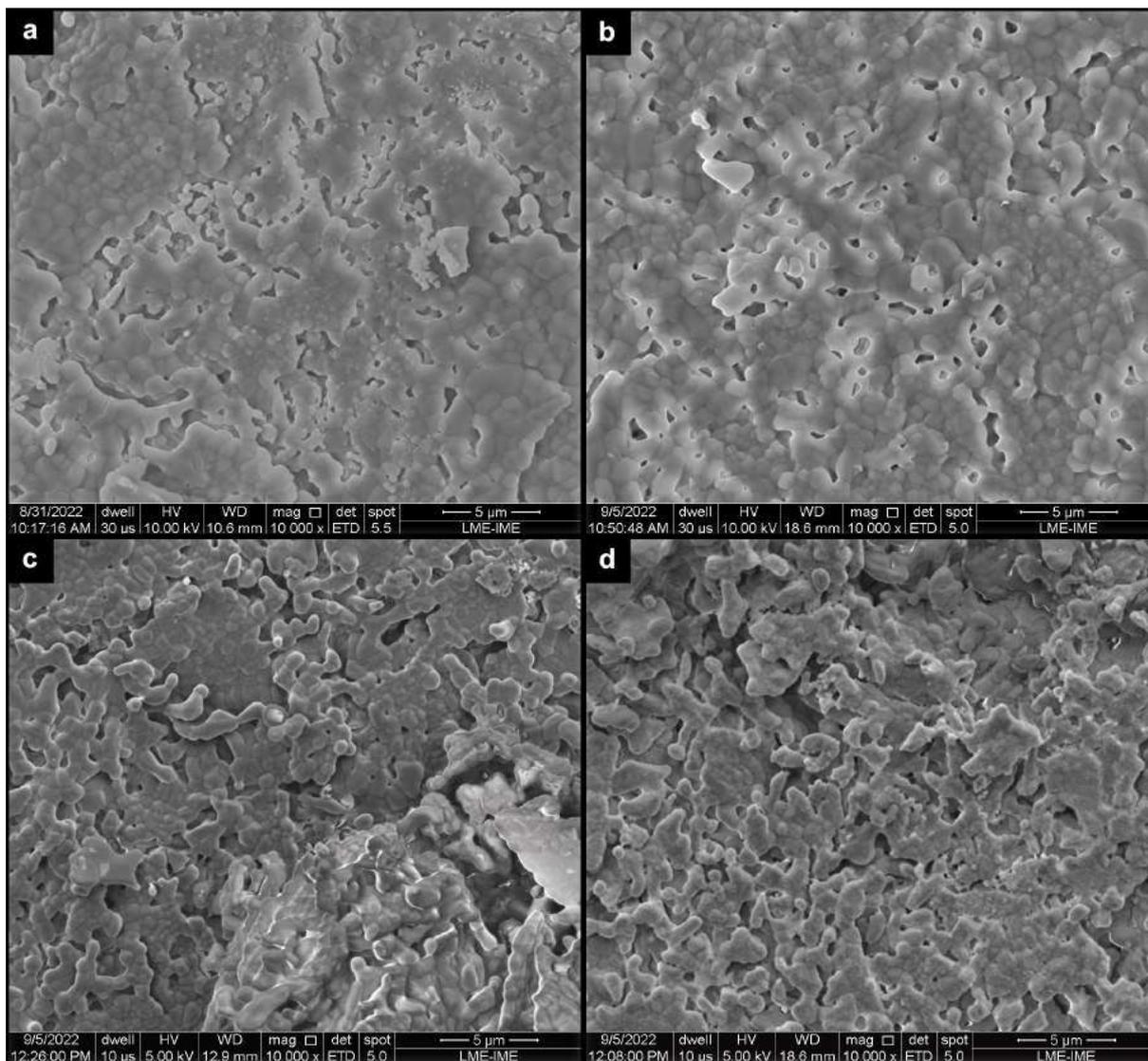


Figura 28 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 2h - 10.000x, (b) 3h - 10.000x, (c) 4h - 10.000x, (d) 5h - 10.000x.

Na Figura 29 e Figura 30 é evidenciado o período de 6h e 12h em diferentes magnificações; em ambas as micrografias se pode observar em (a) a presença de pequenas regiões mais conhecidas com aspecto de “manchas” (em uma menor magnificação); em (b) é apresentado uma magnificação maior elucidando o aspecto das “manchas” como regiões um pouco mais coalescidos; e em (c) já pode ser notado, com uma maior magnificação, a confluência dos glóbulos esféricos em determinadas áreas.

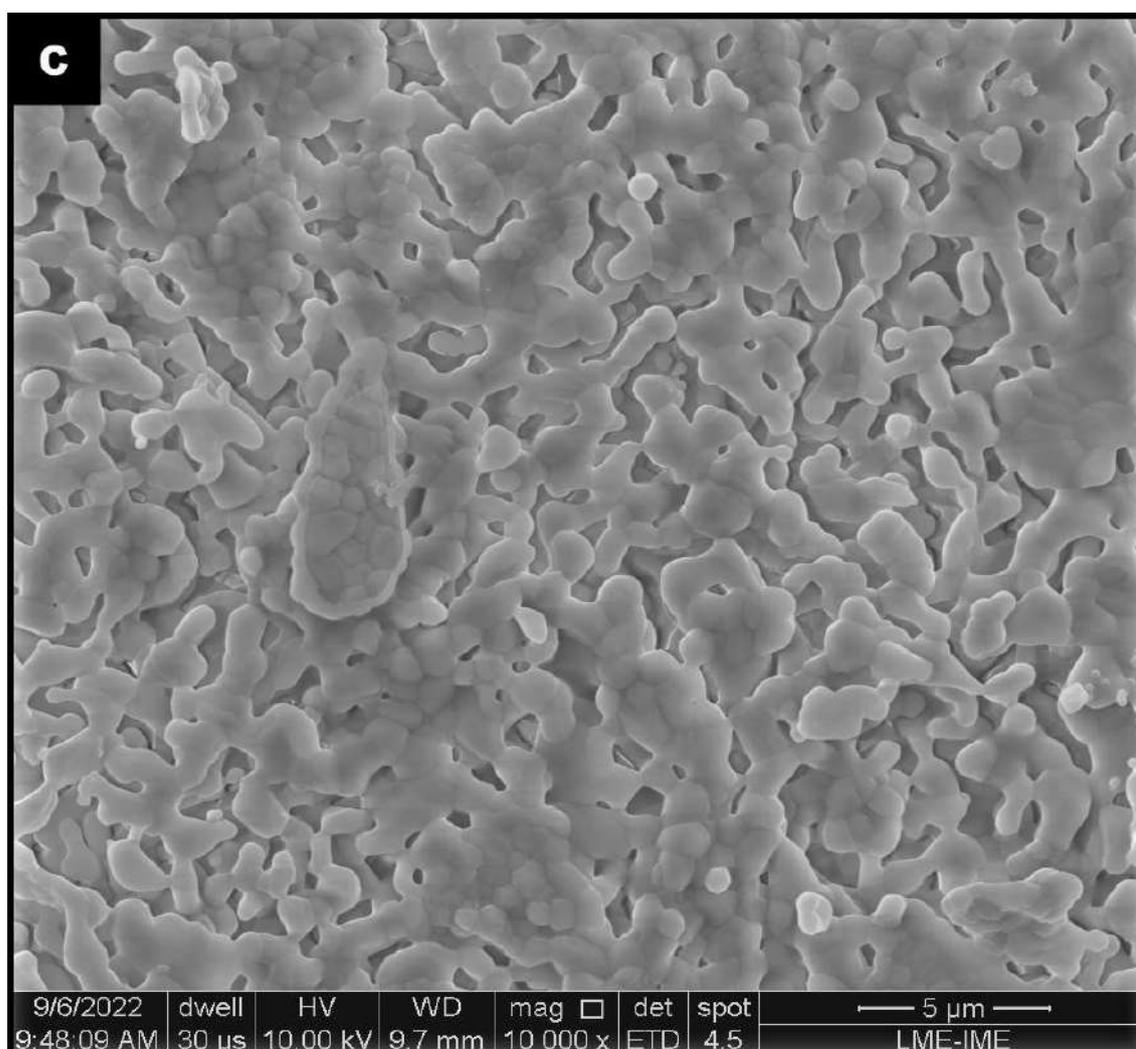
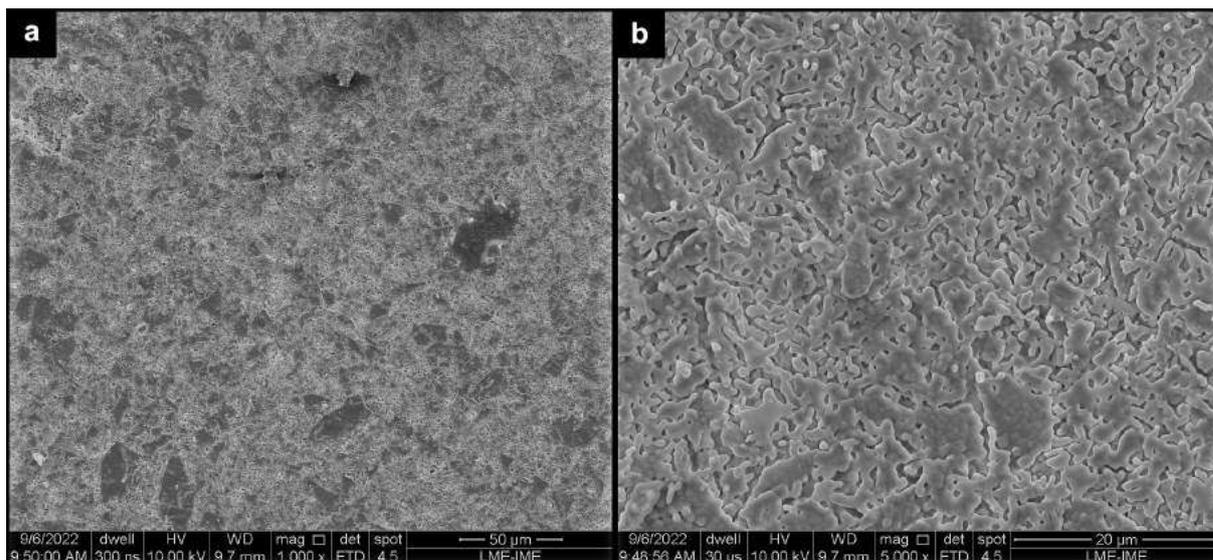


Figura 29 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 6h - 1.000x, (b) 6h - 5.000x, (c) 6h - 10.000x

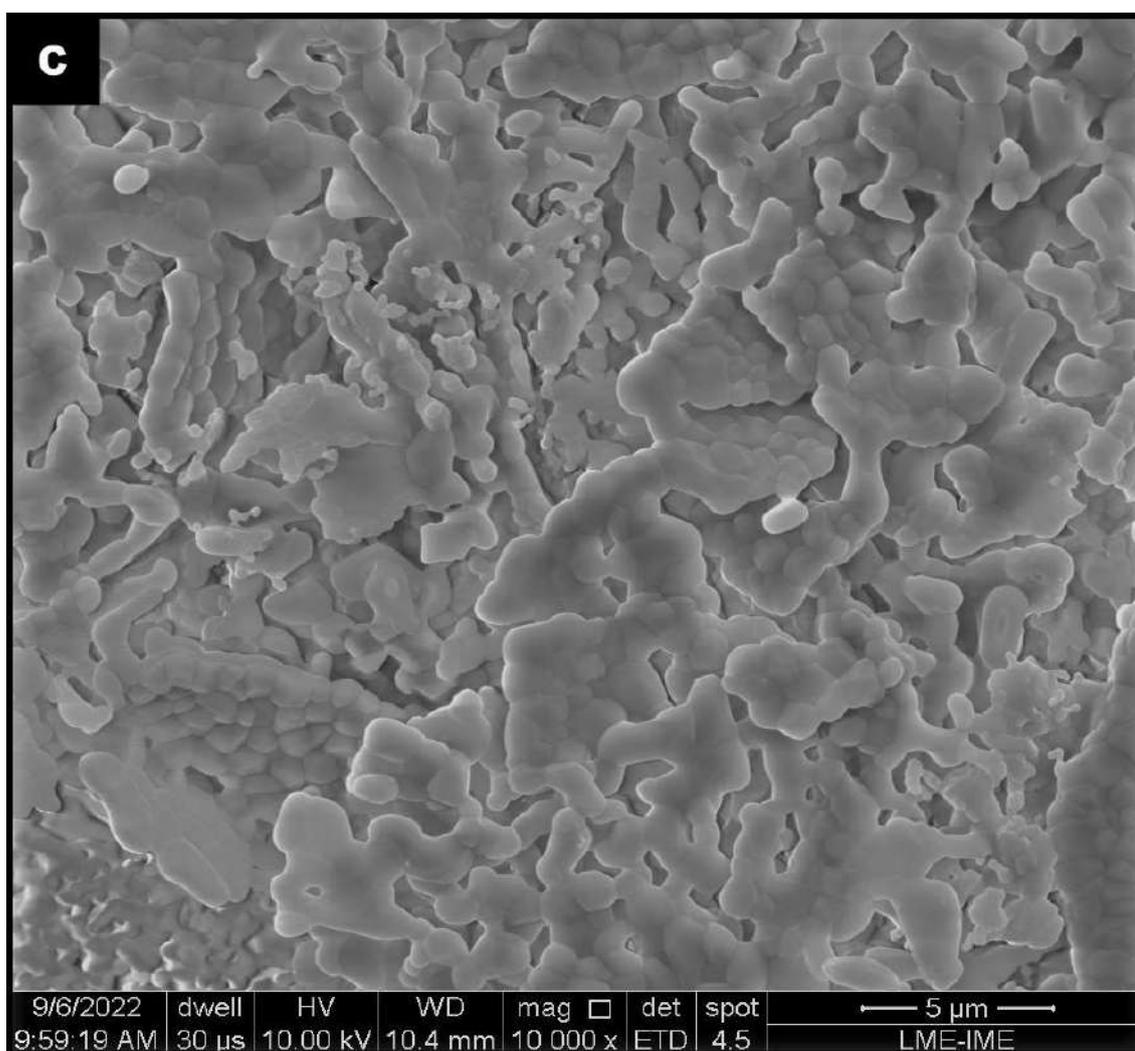
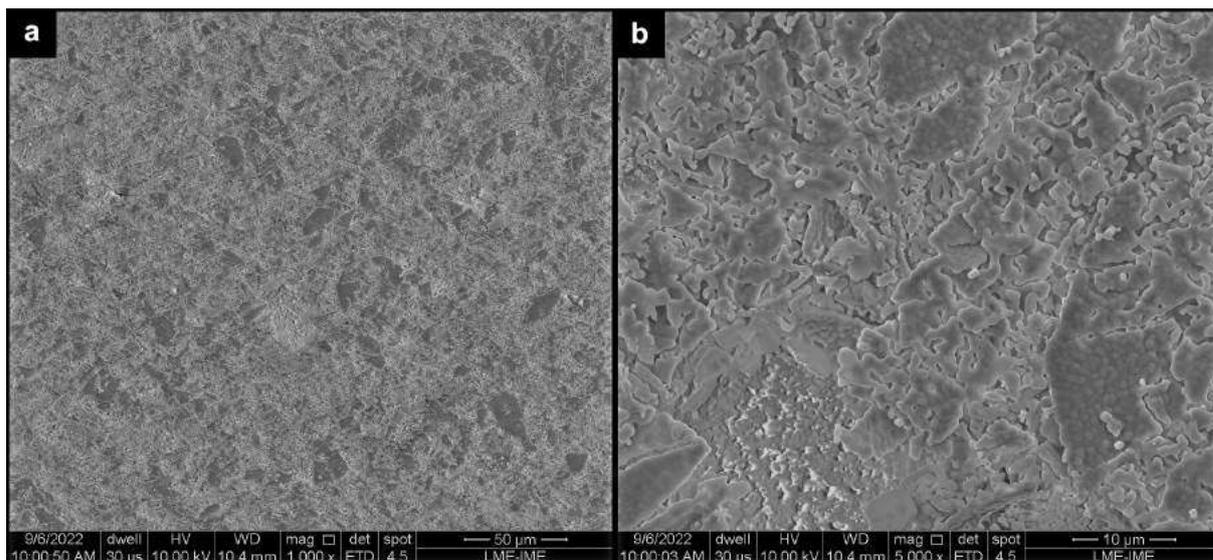


Figura 30 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 12h - 1.000x, (b) 12h - 5.000x. (c) 126h - 10.000x

Algumas observações podem ser analisadas até esse momento para o grupo *CaP* a partir do teste piloto (2h até 12h). Sendo assim, embora haja ausência visível de precipitação, é possível observar o aparecimento de aglomerados na superfície com o passar do tempo (com aspecto planificado), como se os glóbulos esféricos estivessem coalescidos. Nesse sentido, o grupo *CaP* foi analisado nos períodos de 24h, 48h, 72h, 168h, e 336h. Na Figura 31 é identificado o período de (a) 24h e (b) 48h (com mesma magnificação para ambos); nesses dois períodos já se consegue observar uma evolução do aspecto anterior, e agora descrito como regiões mais coalescidas em aspecto de placas.

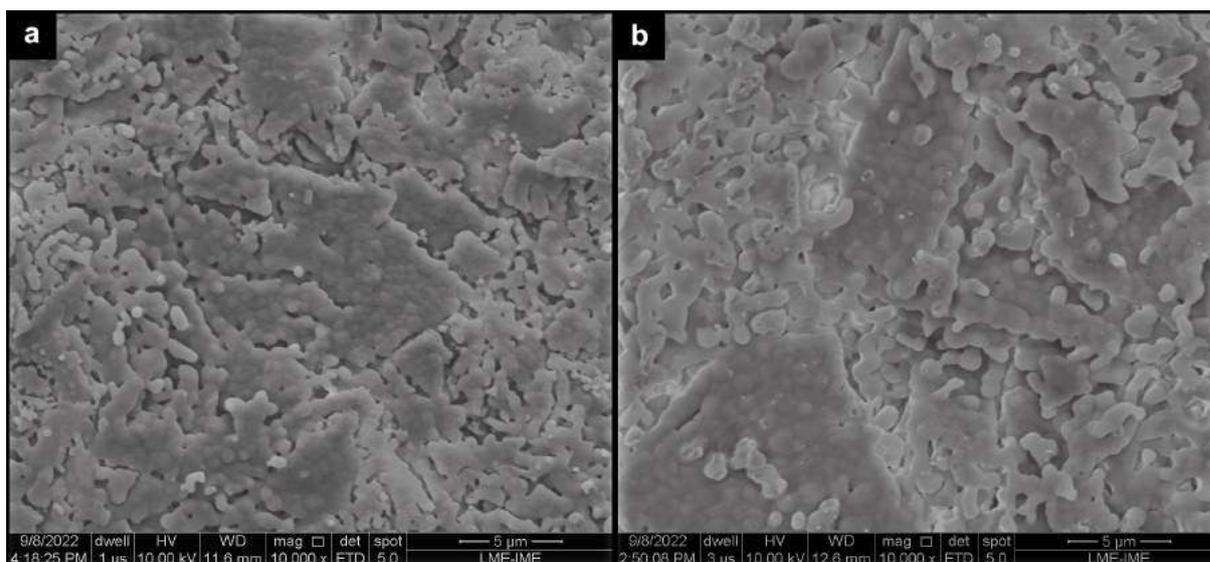
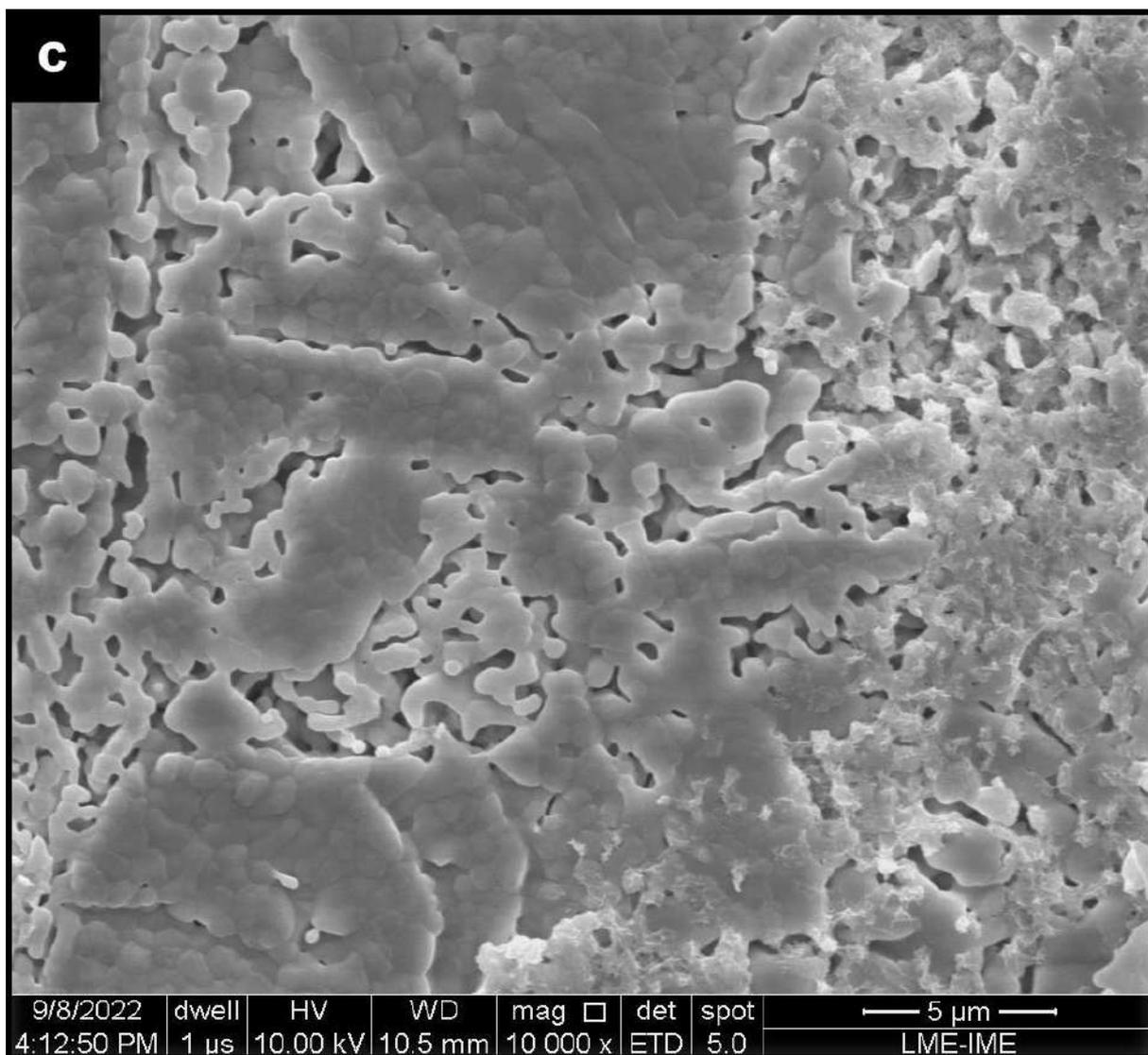
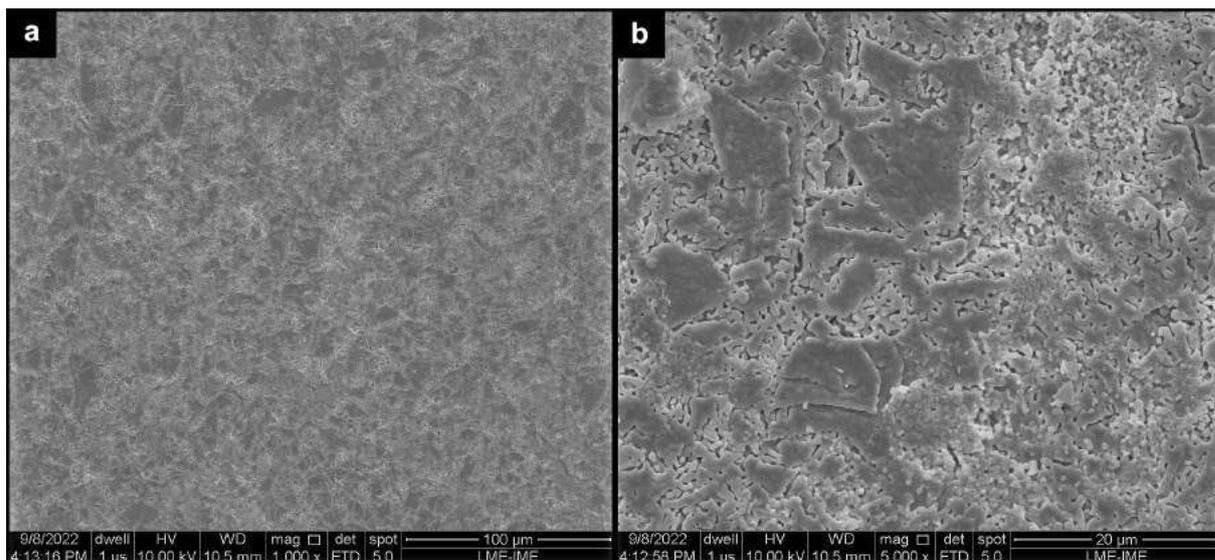


Figura 31 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 24h - 10.000x, (b) 48h - 10.000x.

A Figura 32 apresenta o período de 72h em diferentes magnificações; em (a) pode se observar, em menor aumento, a evidenciação das placas com suas demarcações melhor definidas; em (b) esse aspecto é melhor evidenciado e surge a presença de algumas estruturas espiculadas em pequenas regiões; em (c) e (d) é possível observar estruturas de superfície com aparência sugestiva de precipitações.



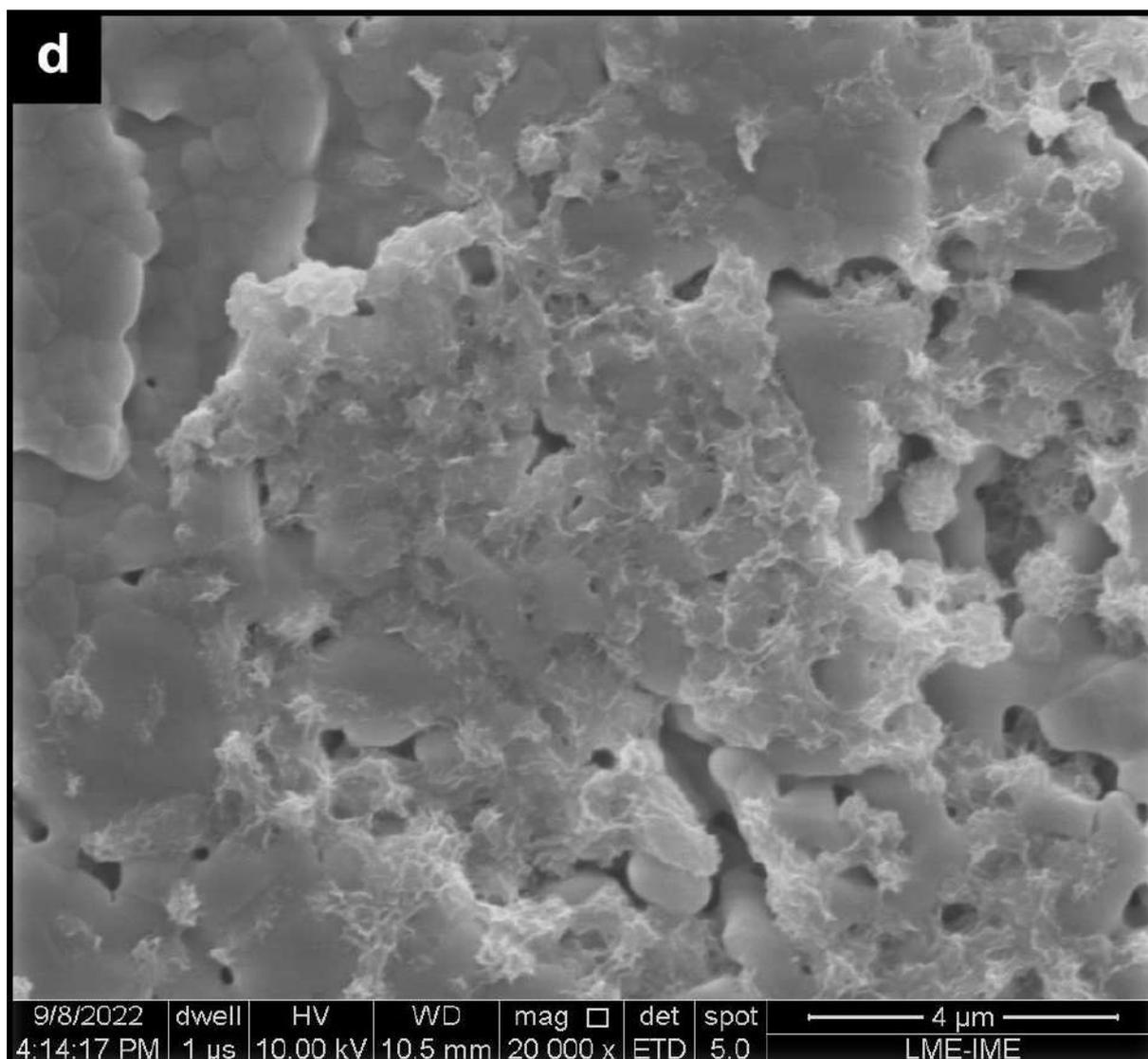


Figura 32 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 72h - 1.000x, (b) 72h - 5.000x, (c) 72h - 10.000x, (d) 72h - 20.000x.

Isso enquanto na Figura 33 é identificado os períodos de (a) 168h e (b) 336h com o mesmo aumento de 10.000x. No qual é evidenciado melhor a estrutura das placas que surgiram na superfície das pastilhas.

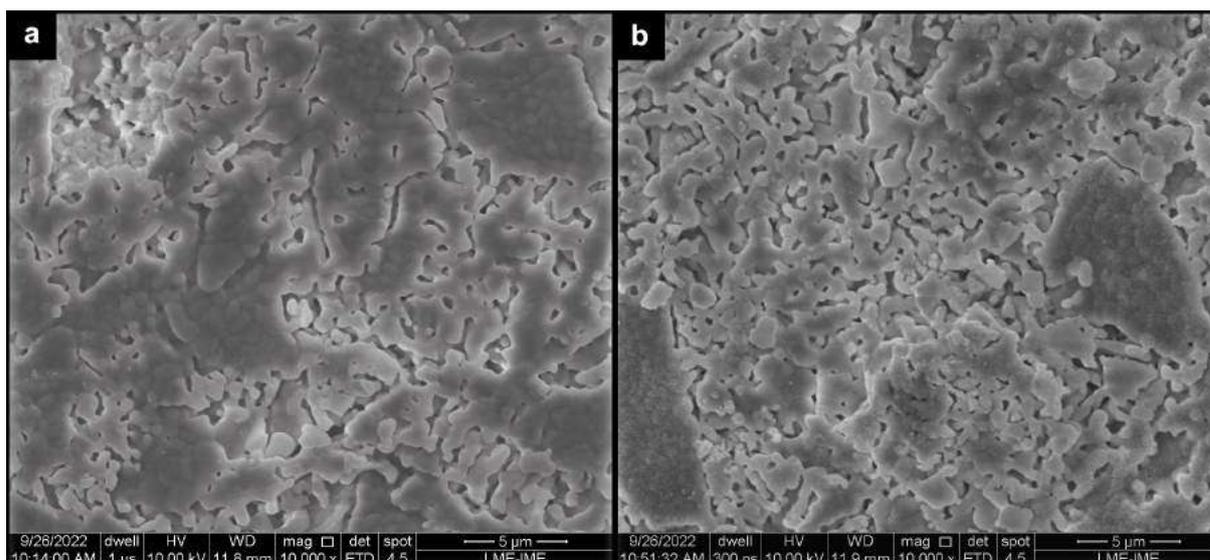
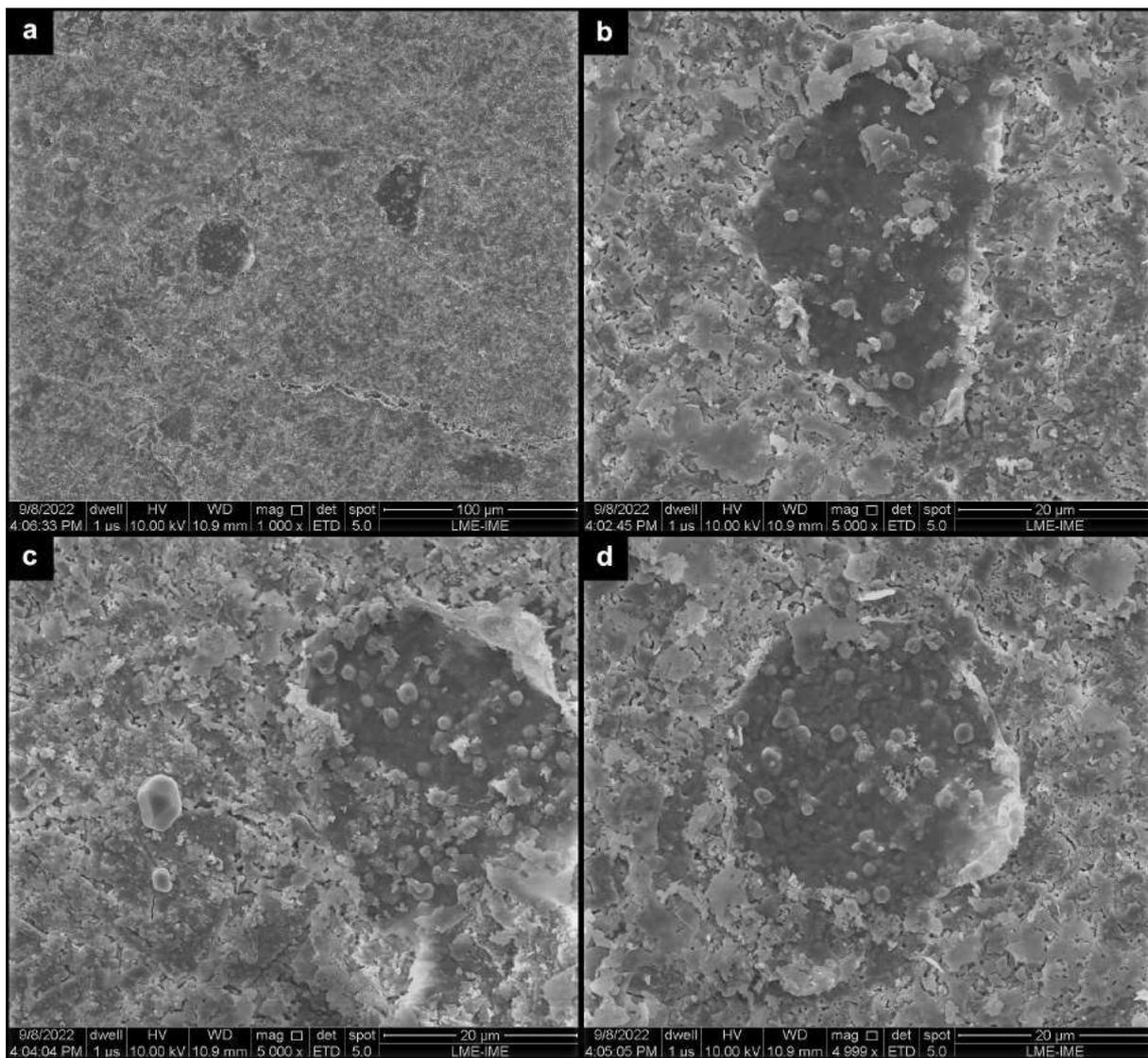


Figura 33 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 168h - 10.000x, (b) 336h - 10.000x.

Nesse sentido, a Figura 34 mostra melhor a morfologia, em diferentes magnificações, das placas que surgiram no grupo *CaP* no período de 168h. A partir desse período de tempo, as placas já se mostram como estruturas mais delgadas, robustas e mais uniformes, com aspecto de coalescimento difuso, meio transparente, que não permite ver os glóbulos esféricos abaixo.



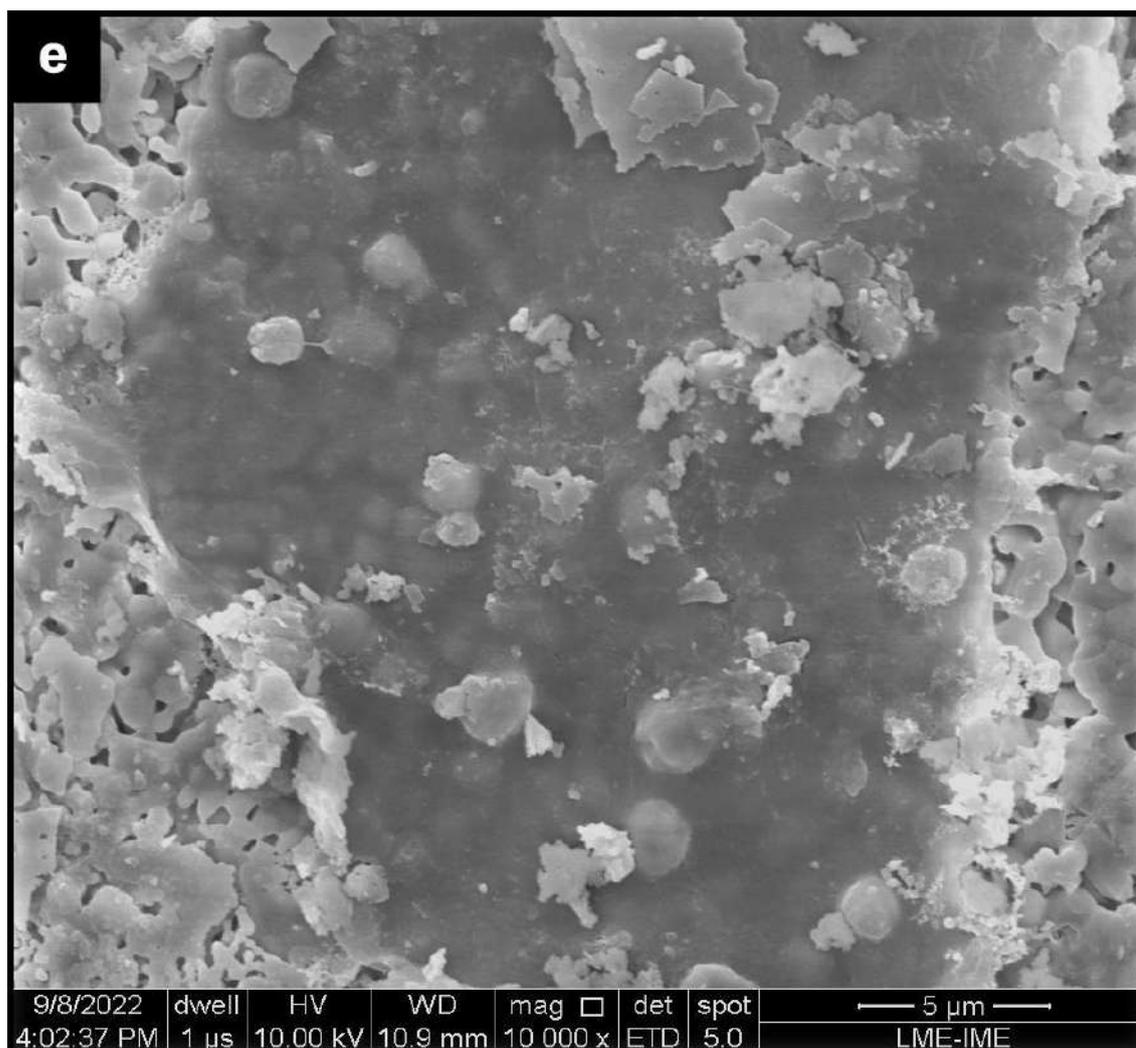


Figura 34 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio de cultura McCoy. (a) 168h - 1.000x, (b) 168h - 5.000x, (c) 168h - 5.000x, (d) 168h - 4.999x, (e) 168h - 10.000x.

As pastilhas do grupo $CaP_{Peptideo}$ foram analisadas nos períodos de tempo 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e 12h como testes-piloto. Na Figura 35, é apresentado em (a) 2h e em (b) 3h, ambas as micrografias com o mesmo aspecto inicial semelhante às pastilhas de $CaP_{Sinterizada}$ (Figura 35).

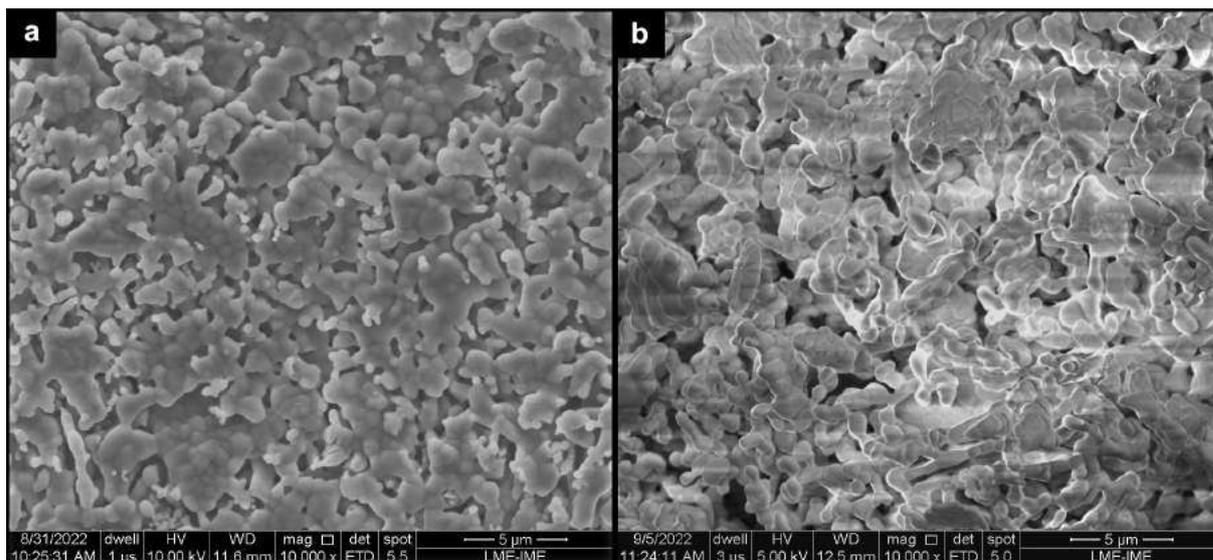
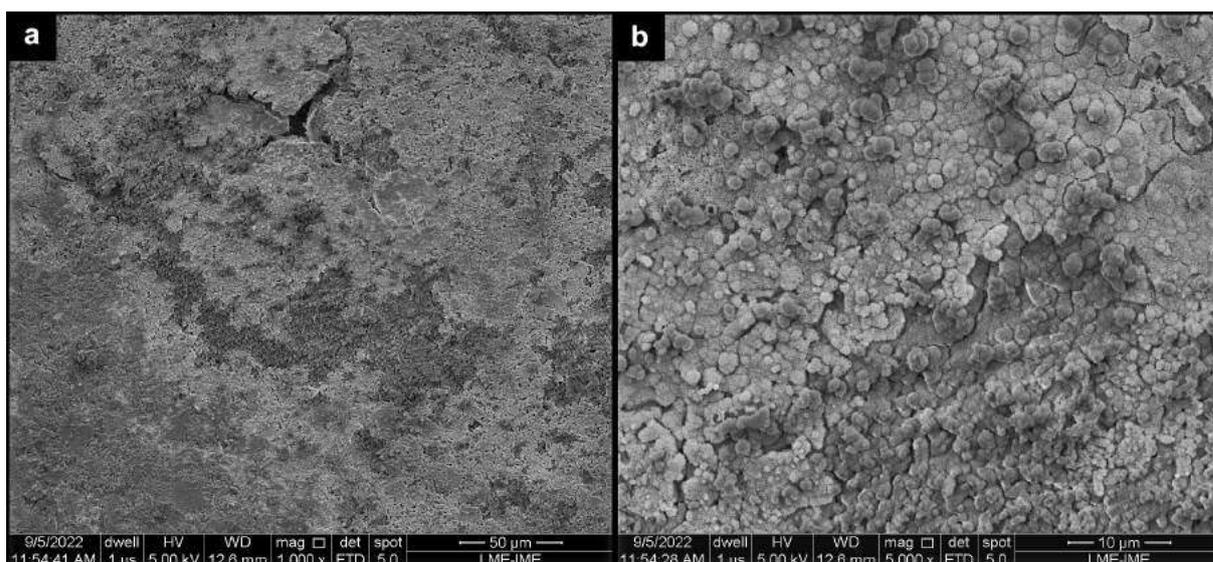


Figura 35 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 2h - 10.000x, (b) 3h - 10.000x.

Na Figura 36 é apresentado o período de tempo de 4h em diferentes aumentos; em (a) pode ser observado, em um aumento menor, um aspecto mais rugoso na superfície; enquanto que em (b) e (c) é notável, em aumentos maiores, a forma de glóbulos esféricos bem definidos com aparência “espinhos” e “picos”, o que sugere presença de precipitações recobrendo toda a superfície.



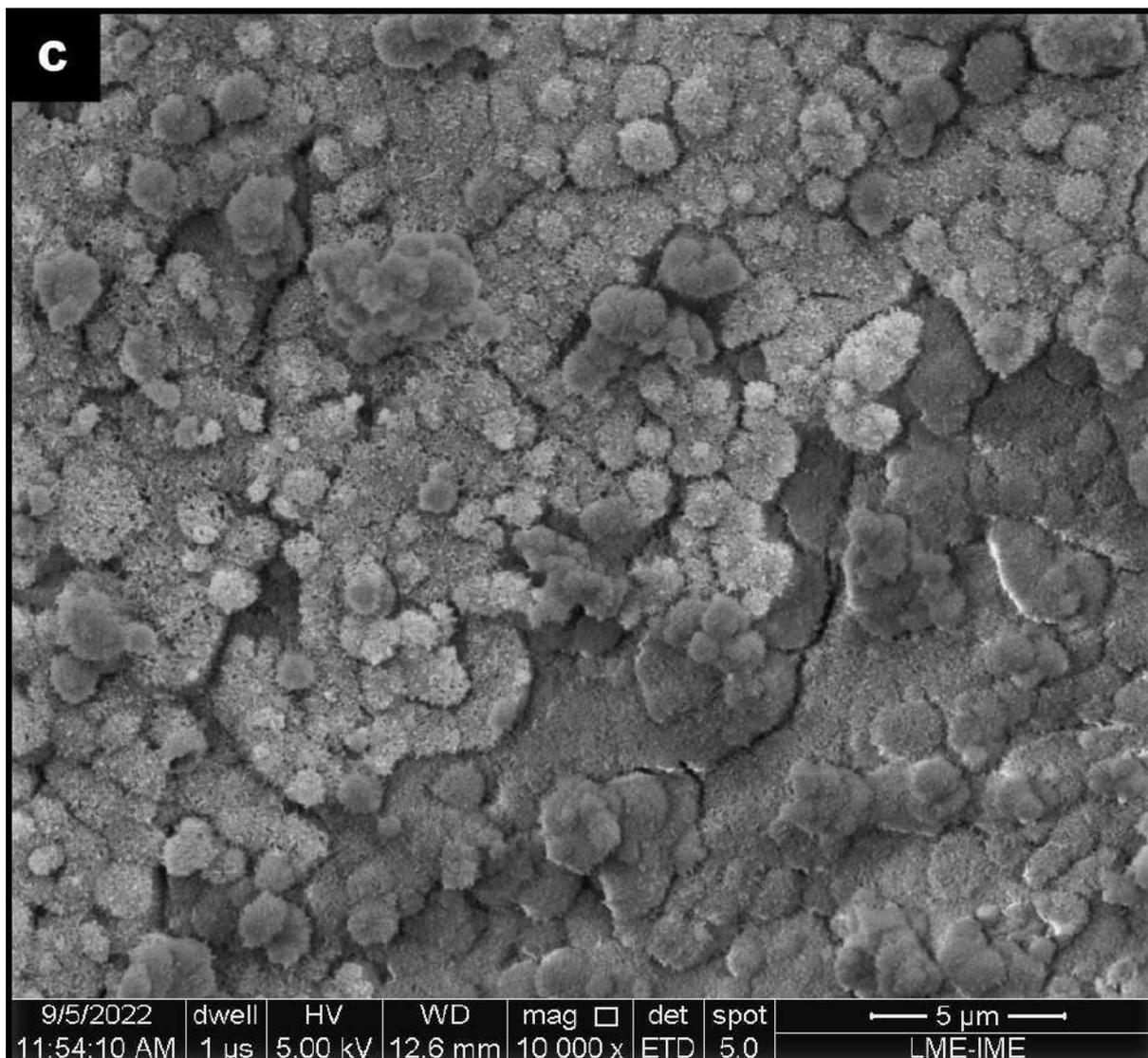


Figura 36 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 4h - 1.000x, (b) 4h - 5.000x, (c) 4h - 10.000x.

Na Figura 37 pode se observar o período de 5h em diferentes magnificações; assim, se pode perceber uma evolução do aspecto anterior (Figura 36), no qual ao invés de haver um recobrimento de precipitação por toda a superfície, há o começo de formação de “precipitações para cima” sugerindo a presença de estruturas aglomeradas. Isso enquanto a Figura 38 (período de 6h) evidencia o mesmo aspecto.

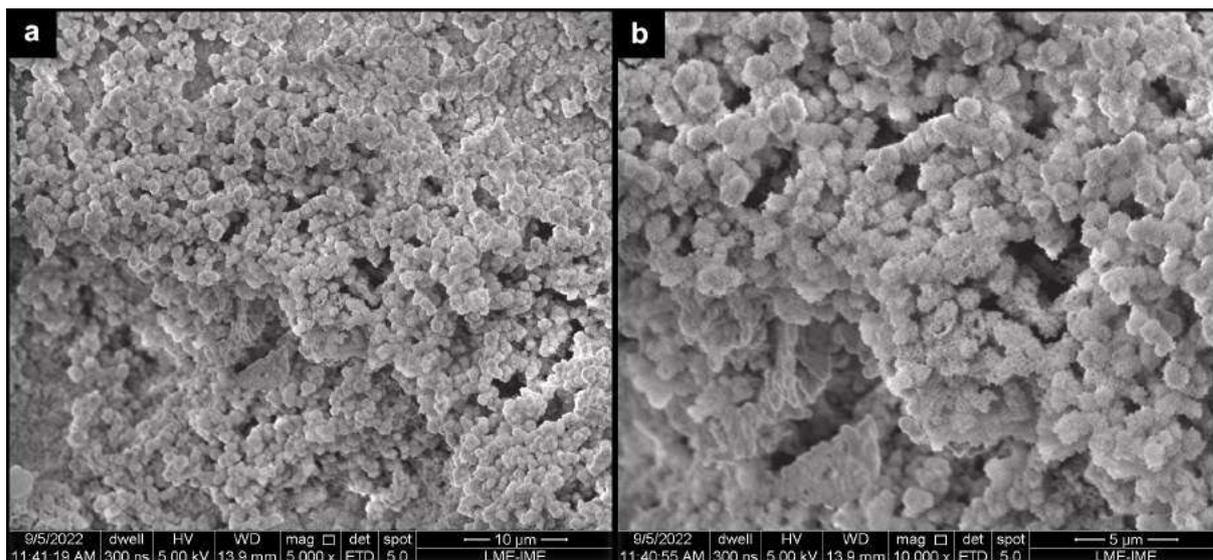


Figura 37 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 5h - 5.000x, (b) 5h - 10.000x.

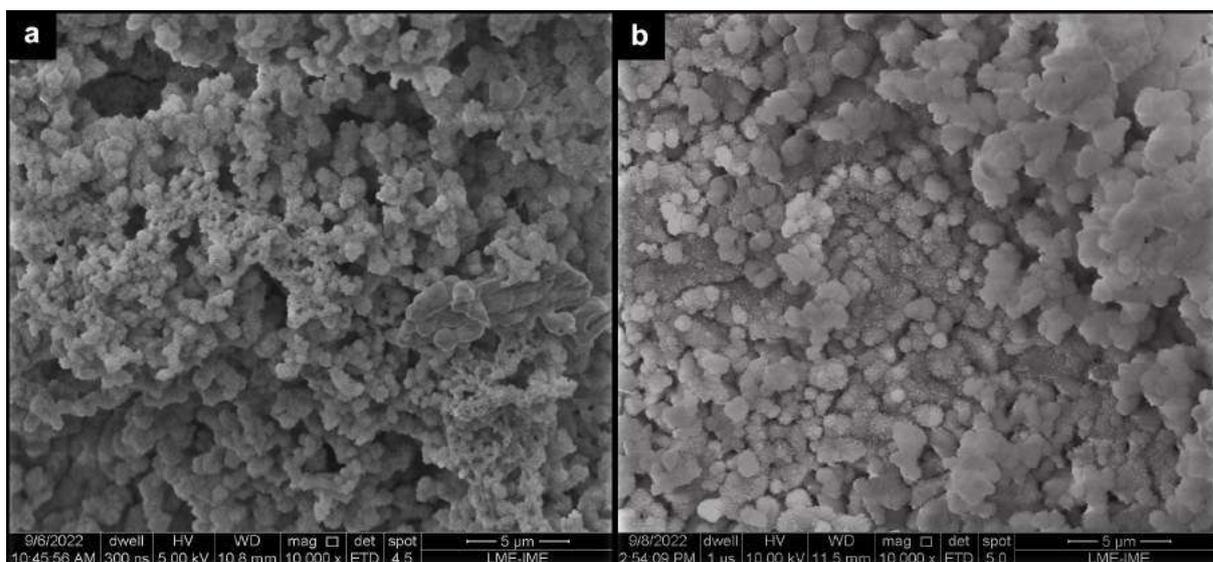


Figura 38 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 6h - 10.000x, (b) 12h - 10.000x.

Até esse momento, se pode fazer algumas considerações sobre o grupo $CaP_{Peptide}$. Nesse grupo as precipitações se apresentam com uma conformação estrutural nítida e bem delineada com glóbulos esféricos melhor definidos

Nesse sentido, o grupo $CaP_{Peptide}$ foi analisado nos períodos de 24h, 48h, 72h, 168h, e 336h. Na Figura 39 é identificado os períodos de 24h e 48h com o mesmo aumento

para ambos, no qual se consegue observar a presença de glóbulos esféricos maiores, melhor definidas e mais delgadas (em relação aos períodos anteriores), isso além da conformação de aglomerados.

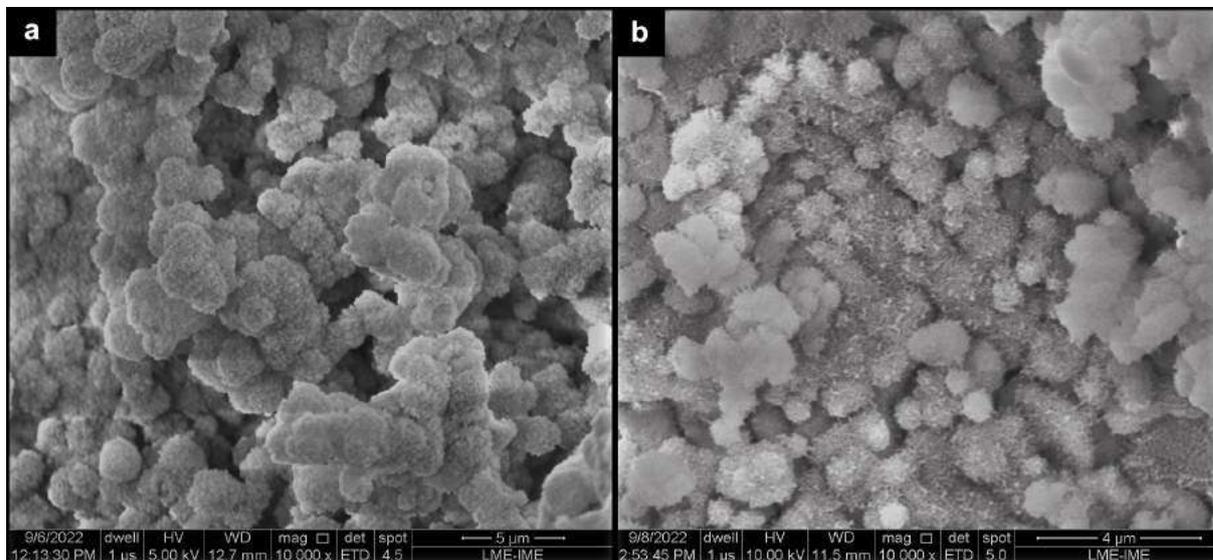


Figura 39 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade grupo Peptídeo. (a) 24h - 10.000x, (b) 48h - 10.000x.

Na Figura 40 é apresentado, com a mesma magnitude, os períodos de 72h e 168h. Em ambos se pode observar uma compactação esférica em relação aos períodos de 24h e 48h (Figura 39).

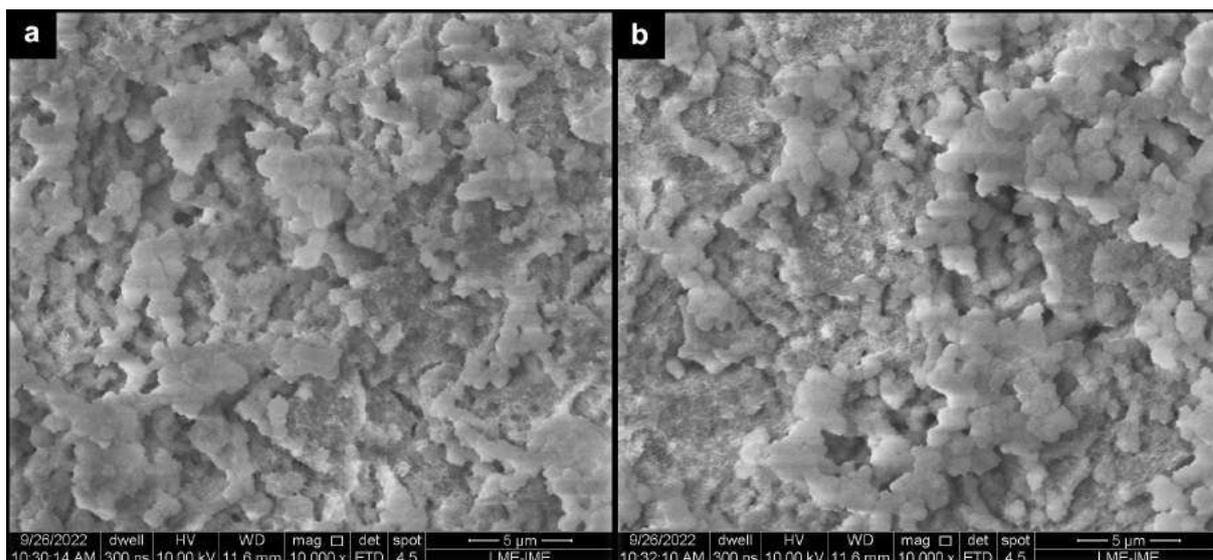
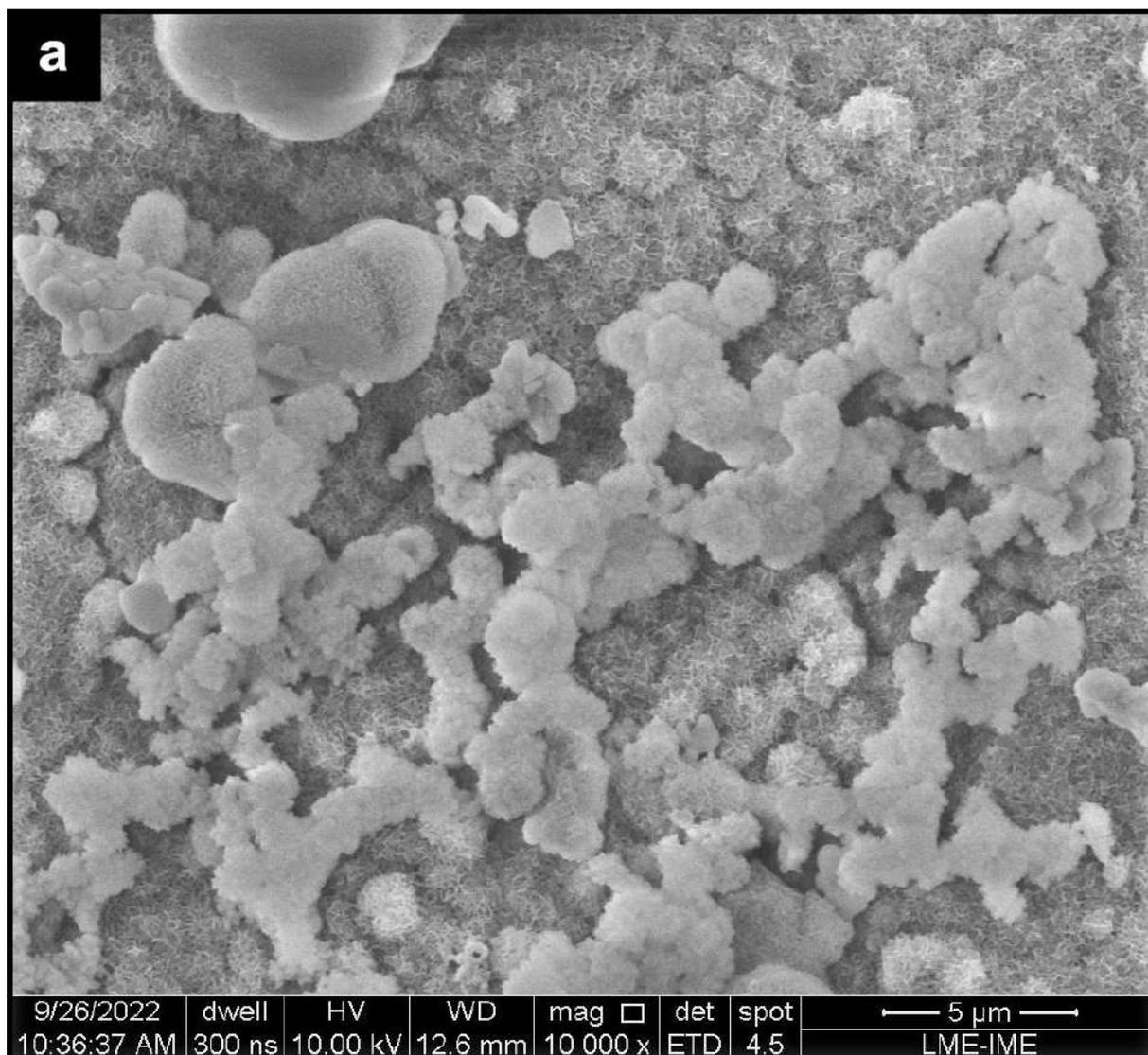


Figura 40 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade grupo Peptídeo. (a) 72h - 10.000x, (b) 168h - 10.000x.

Já na Figura 41 é identificado o período de 336h em maiores aumentos. Em ambos se pode observar uma compactação esférica em relação aos períodos de 24h e 48h (Figura 39). Assim, nota-se uma camada de precipitados bem definida com um aspecto "estrelado" e "agulhado", descrito como apatita semelhante a osso (*bone like apatite*), isso além da presença de aglomerados esféricos em tamanhos diferentes.



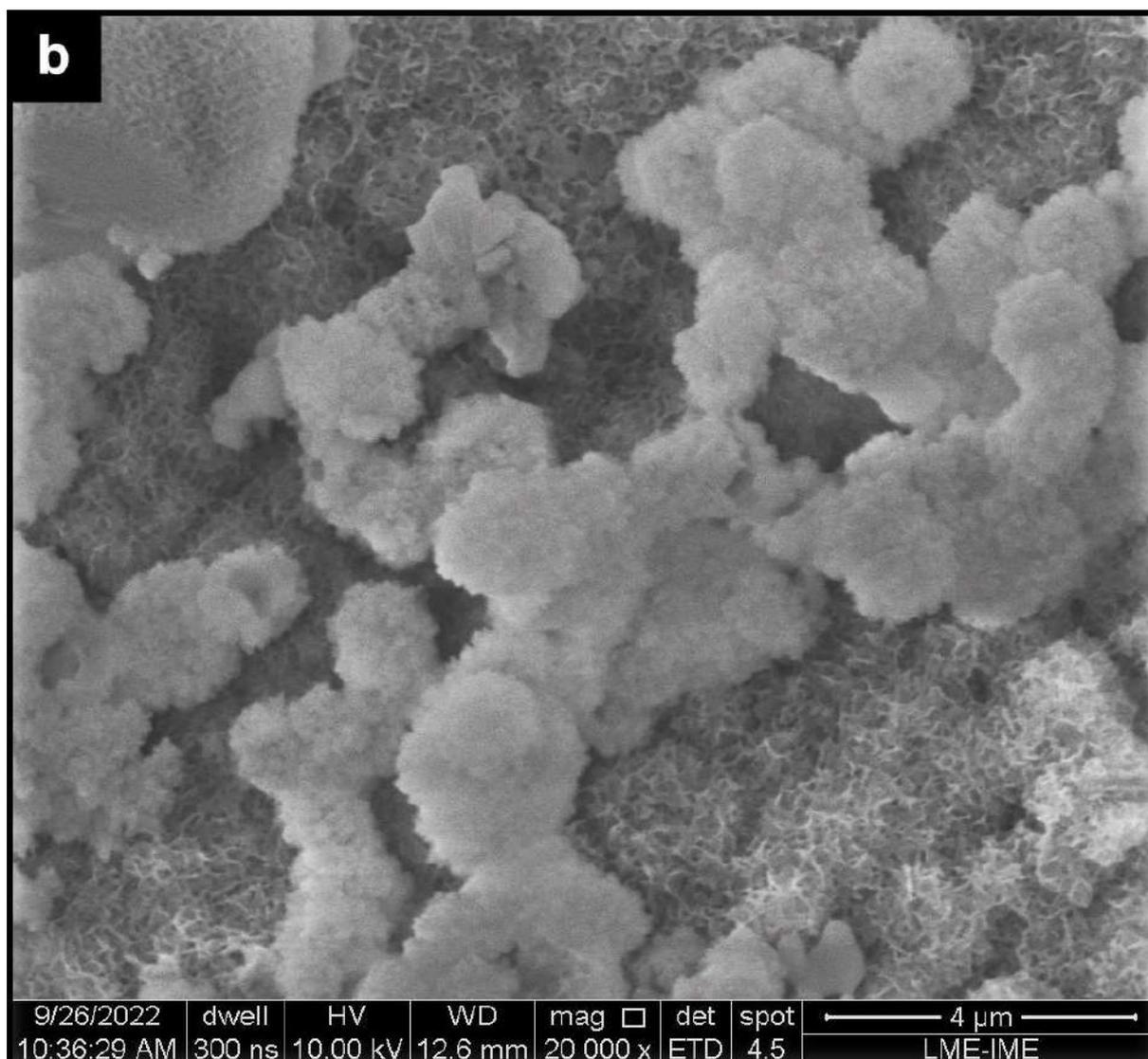
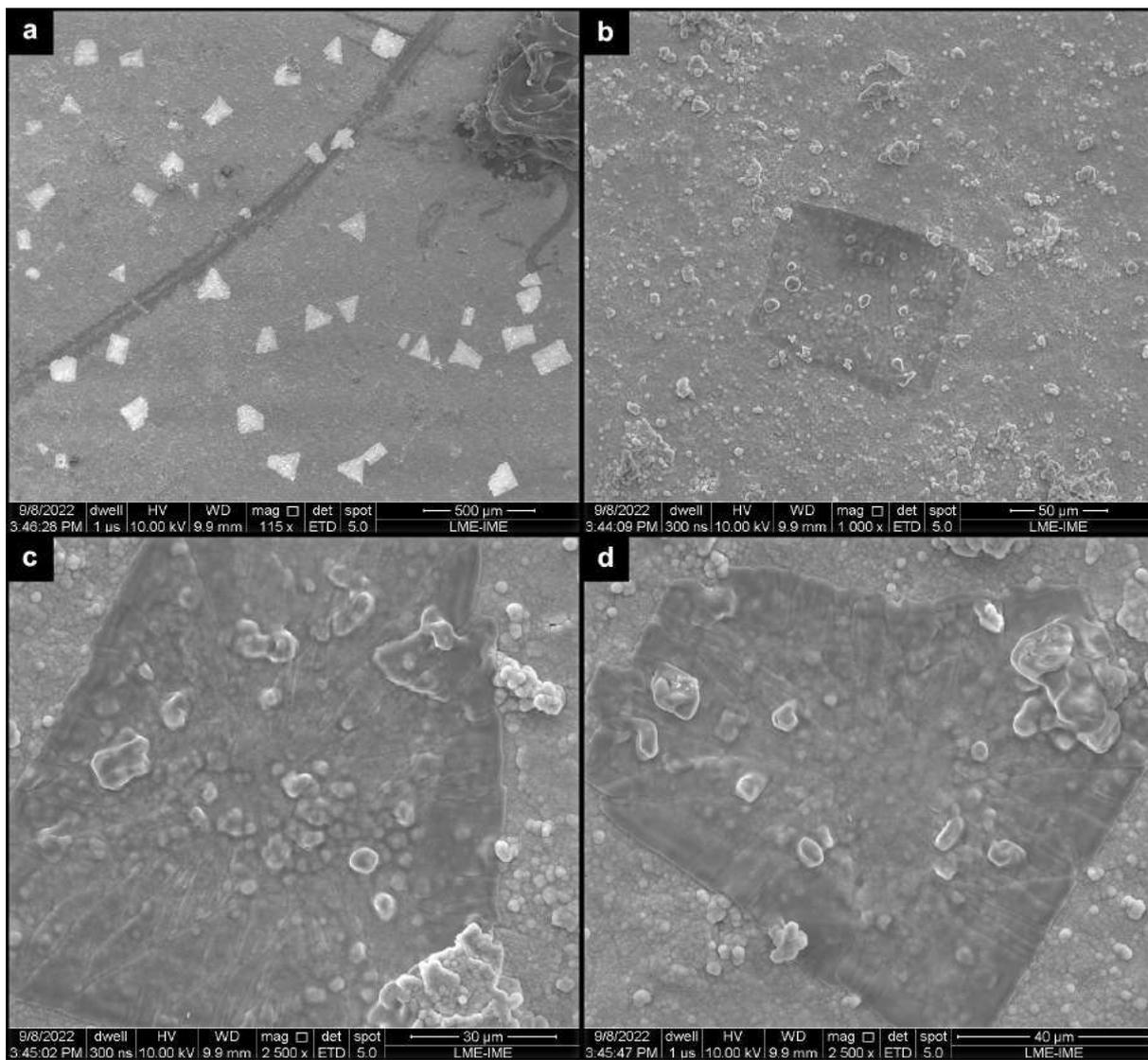


Figura 41 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade grupo Peptídeo. (a) 336h - 10.000x, (b) 336h - 20.000x.

Na Figura 42 respectiva ao período de 168h também foi encontrado a presença de placas difusas bem definidas por toda a superfície das pastilhas, como encontrado no grupo *CaP* também em 168h (Figura 34).



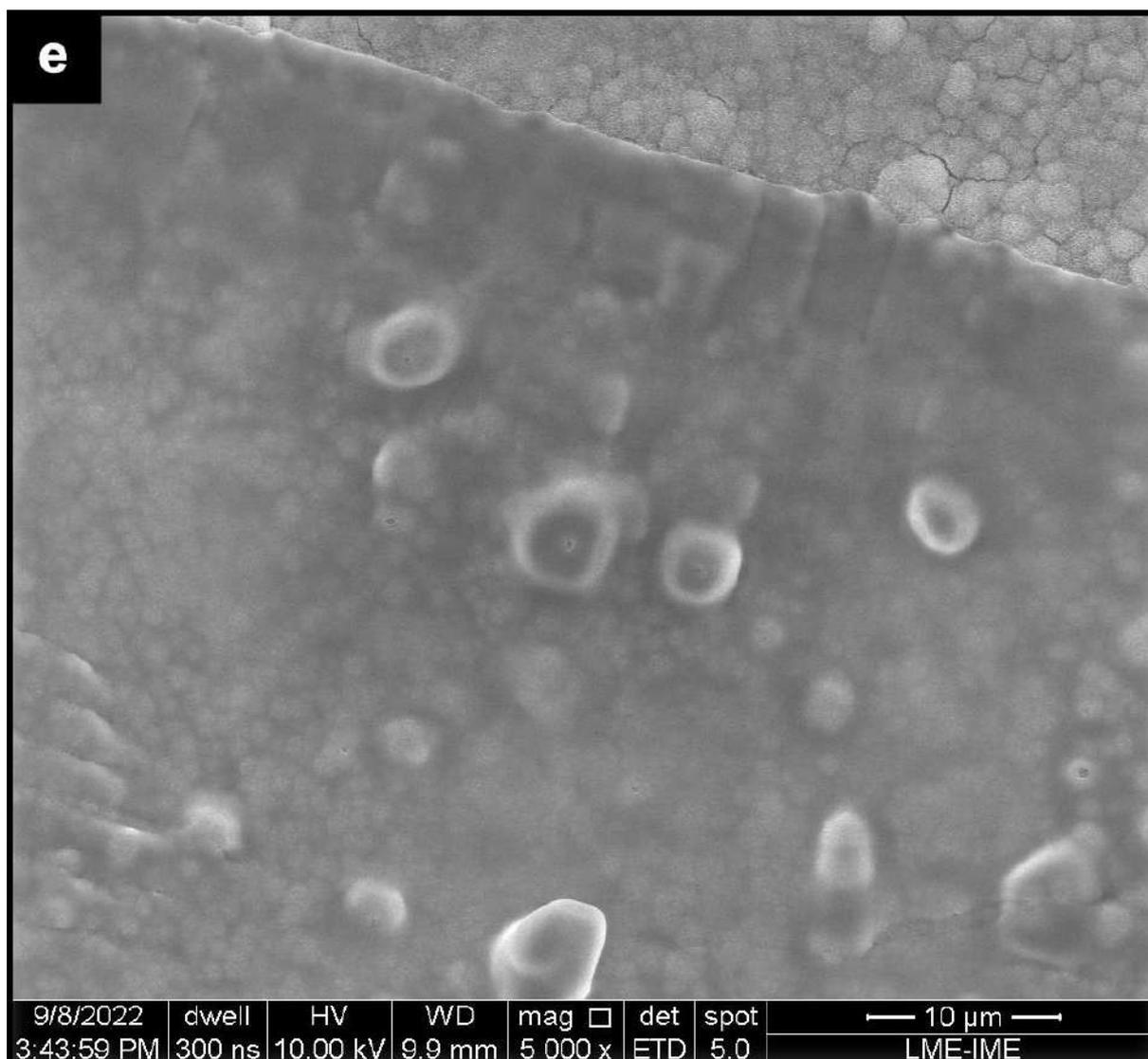


Figura 42 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade grupo Peptídeo. (a) 168h - 115x, (b) 168h - 1.000x, (c) 168h - 2.500x, (d) 168h - 2.500x, (e) 168h - 5.000x.

As pastilhas referentes aos grupos CaP_{PBS} foram analisadas nos períodos de tempo 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e 12h como testes-piloto. Na Figura 43 é perceptível o mesmo aspecto inicial das pastilhas $CaP_{Sinterizada}$ (Figura 26).

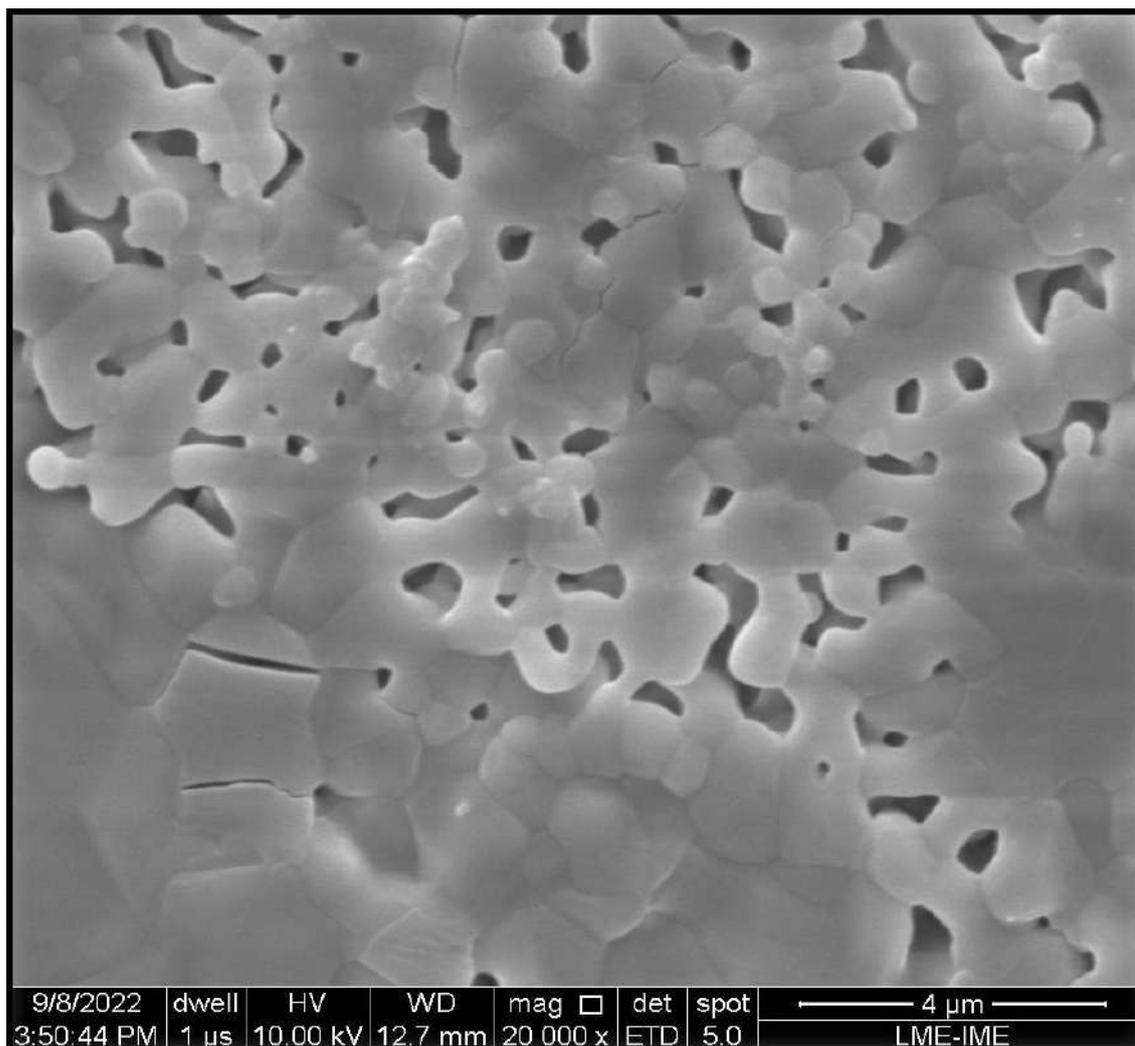


Figura 43 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio PBS. (a) 2h - 20.000x.

A Figura 44 apresenta o período 3h com magnificação de (a) 5.000x e (b) 10.000x, e o período de 4h com magnificação de (c) 5.000x e (d) 10.000x; nesses períodos se pode observar a presença de precipitações visíveis desde 3h, uma hora a menos do que o grupo $CaP_{Peptideo}$ (Figura 36), contudo com ausência de morfologia esférica bem definida quando comparado com o grupo $CaP_{Peptideo}$.

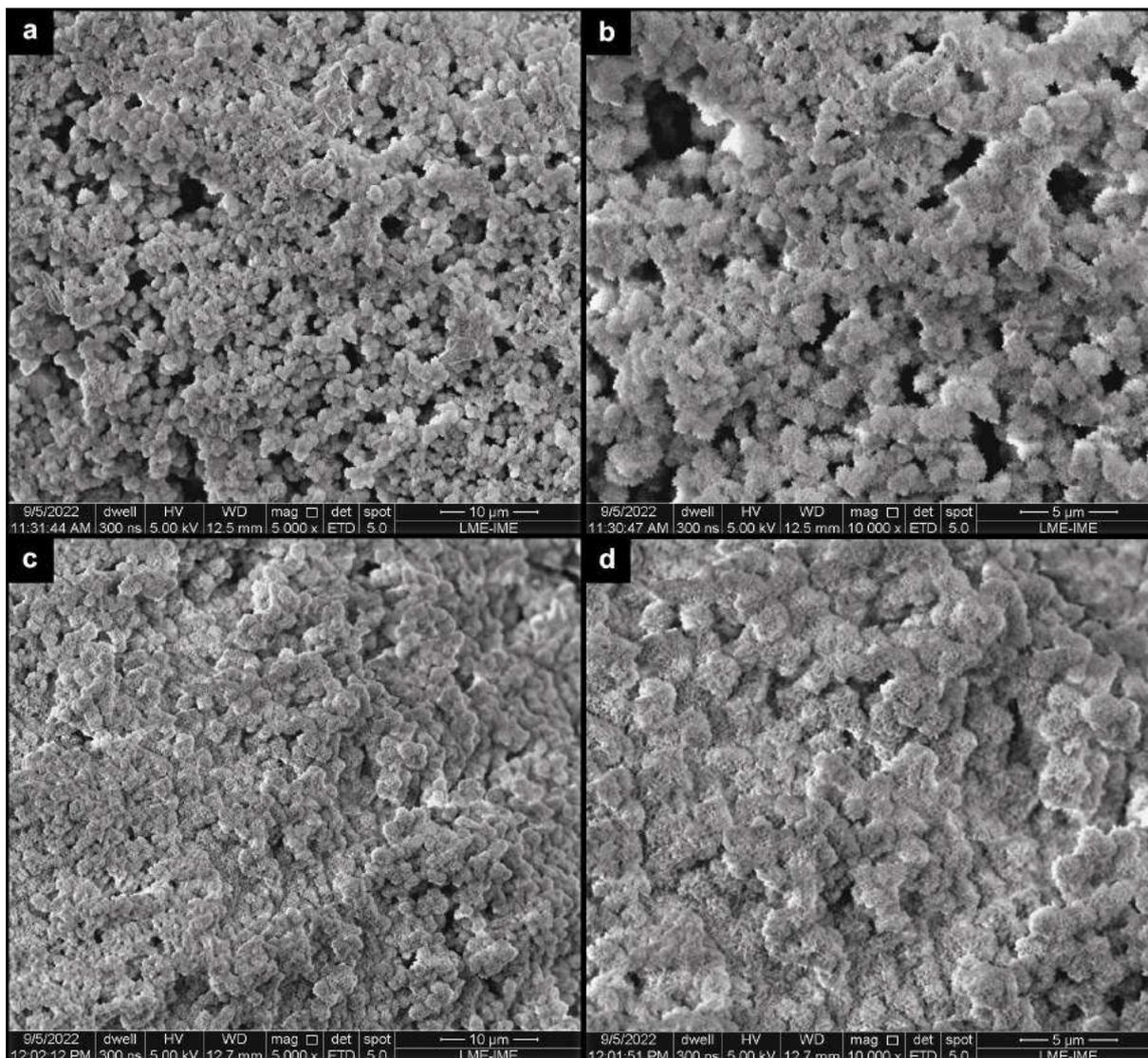
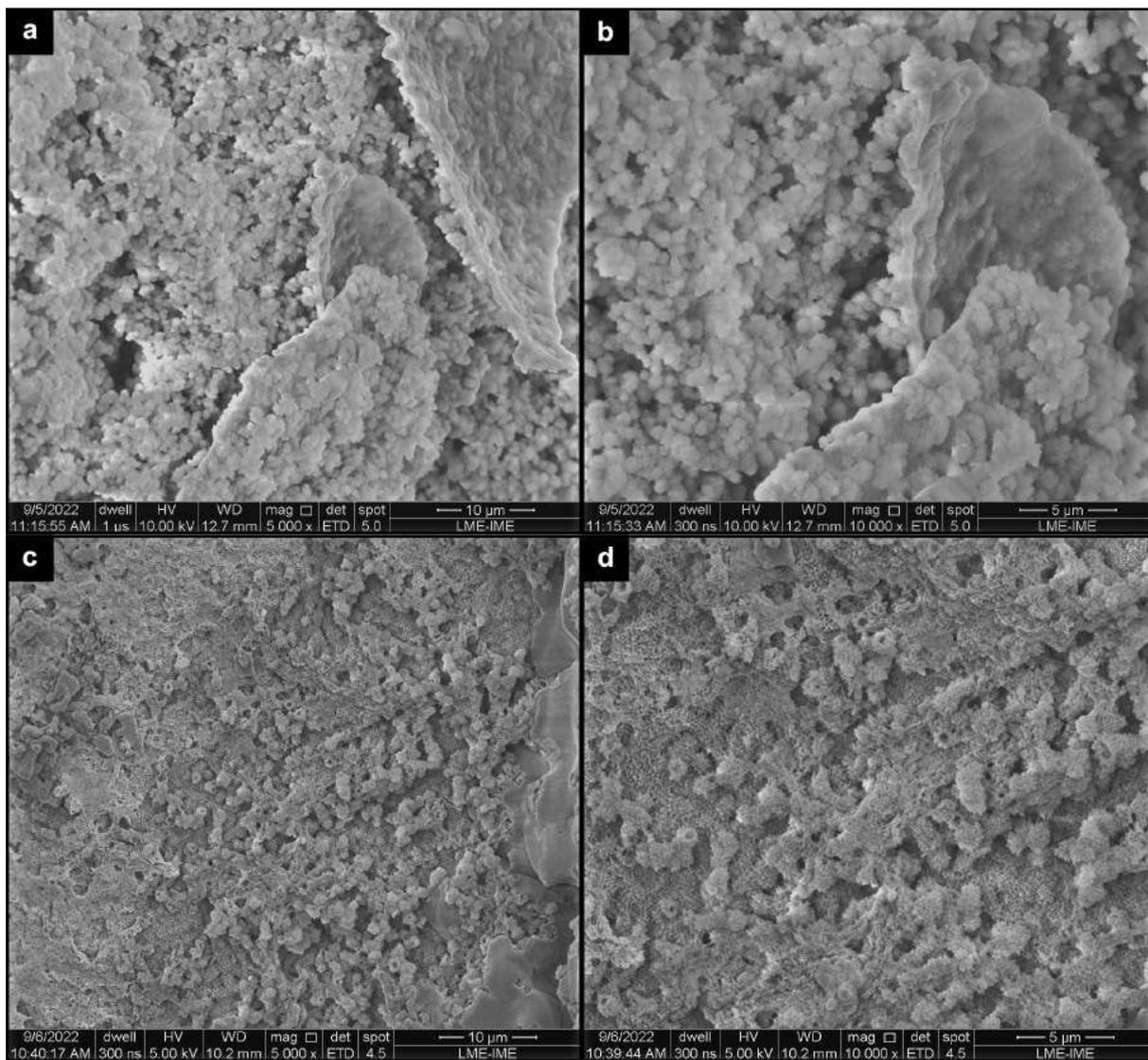


Figura 44 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio PBS. (a) 3h - 5.000x, (b) 3h - 10.000x, (c) 4h - 5.000x, (d) 4h - 10.000x.

Na Figura 45 em (a) e (b) é apresentado o período de 5h em diferentes aumentos, enquanto em (c), (d) e (e) é identificado o período de 6h, também, em diferentes magnificações.

Dessa forma, em 5h (a) e (b) é possível observar a evolução da precipitação com aglomerados esféricos menores, isso em comparação com o grupo $CaP_{Peptideo}$ (Figura 36); enquanto que em 6h (a), (b) e (c) é possível ver a formação de precipitados esféricos maiores e mal definidos.



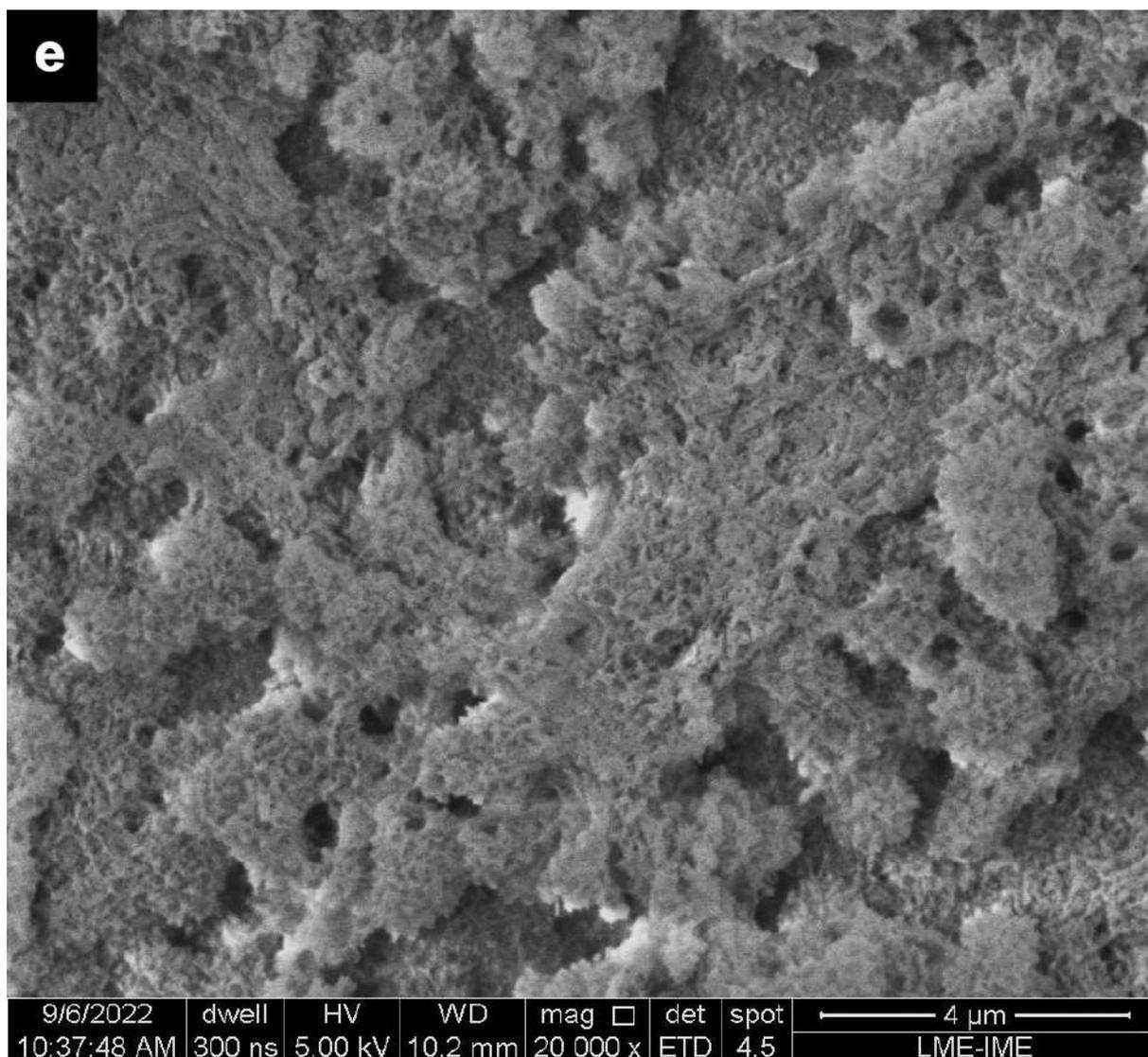


Figura 45 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio PBS. (a) 5h - 5.000x, (b) 5h - 10.000x, (c) 6h - 5.000x, (d) 6h - 10.000x, (e) 6h - 20.000x.

A Figura 46 identifica o período de 12h em diferentes magnificações, evidenciando a conservação do aspecto de 6h com um camada de recobrimento de precipitados gerando um aspecto mais “macio” e menos delineado.

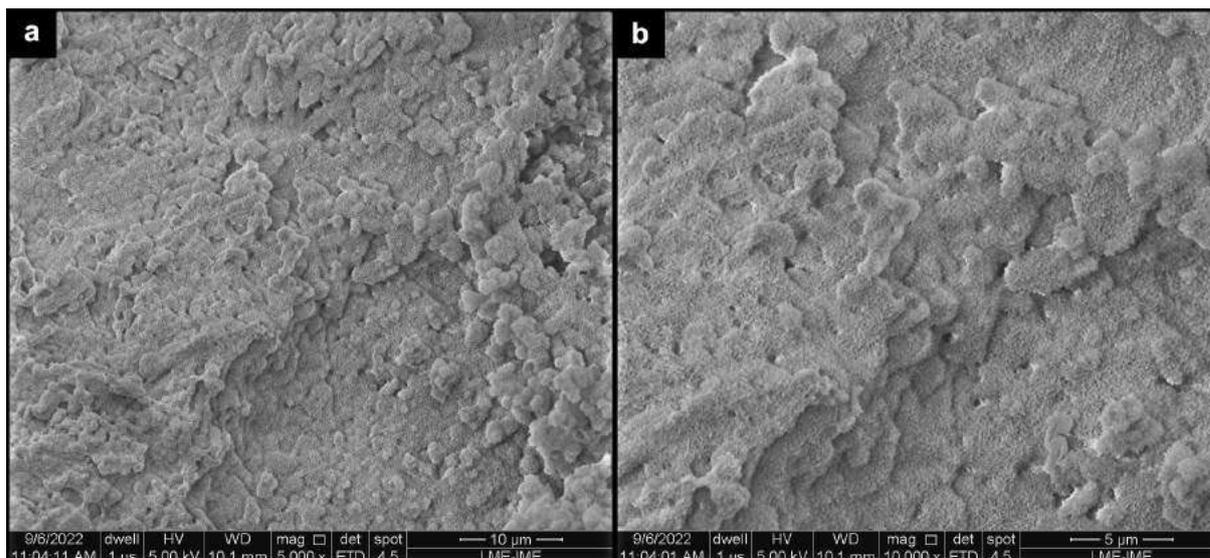
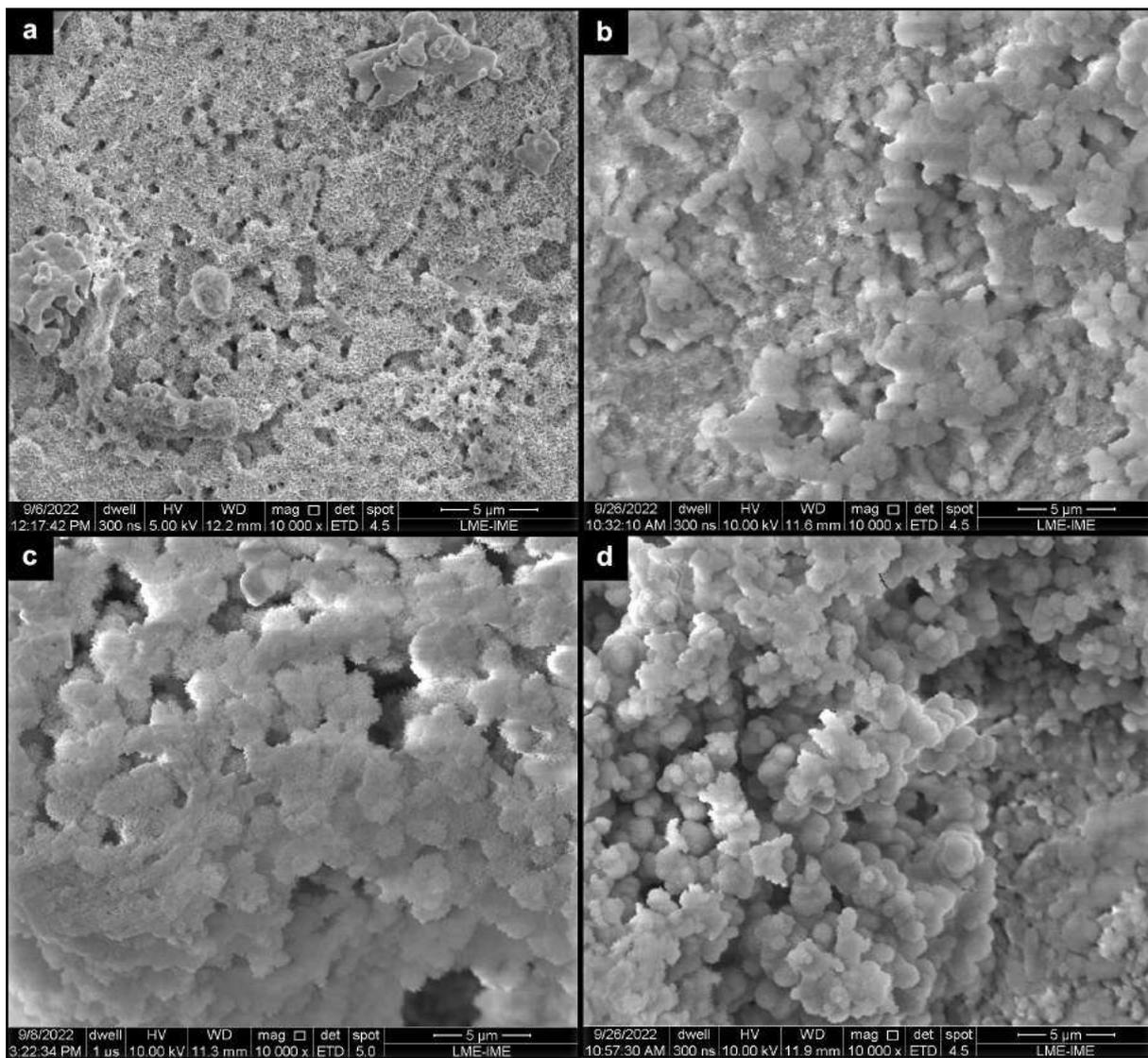


Figura 46 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio PBS. (a) 12h - 5.000x, (b) 12h - 10.000x.

Sendo assim, algumas considerações, também, podem ser feitas para esse grupo. O grupo CaP_{PBS} possui precipitações com uma conformação esférica não muito delineada (glóbulos esféricos não bem definidos), isso em relação ao grupo $CaP_{Peptideo}$.

Nesse sentido, o grupo CaP_{PBS} , também, foi analisado nos períodos de 24h, 48h, 72h, 168h, e 336h. Na Figura 47 é identificado os períodos: (a) 24h, (b) 48h, (c) 72h, (d) 168h, (e) 336h, todos com a mesma magnificação. Assim, em 24h é possível ver um aspecto de precipitação da *bone like apatite*, e assim, aqui já deve haver cristais de CaP formados com direções preferenciais.



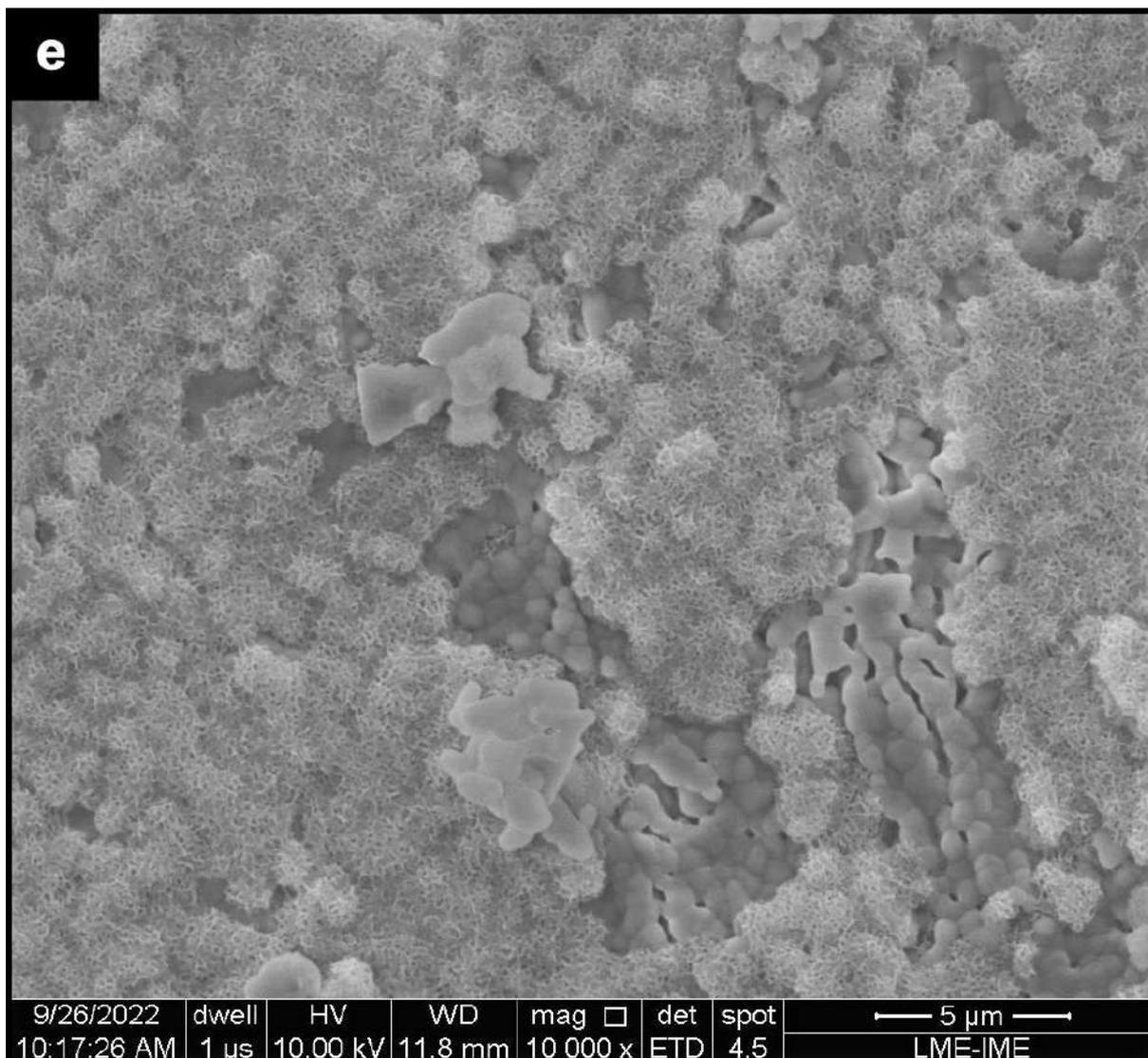


Figura 47 – Morfologia das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de Bioatividade no meio PBS. (a) 24h - 10.000x, (b) 48h - 10.000x, (c) 72h - 10.000x, (d) 168h - 10.000x, (e) 336h - 10.000x.

5.3.1 Padrão de Precipitação

Embora ambos os grupos tenham apresentado precipitações, o grupo *CaP* não evidenciou níveis de precipitação relevantes. Ou ainda pode-se inferir que o tempo necessário para a formação de precipitação foi pequeno para esse grupo, isso em relação aos períodos de tempo do teste de bioatividade. Sendo assim, somente os grupos *CaP_{Peptideo}* e *CaP_{PBS}* expressaram níveis de precipitações significativas com a presença de *bone like apatite*. A partir disso, foi possível constatar acreditáveis padrões de precipitações para cada grupo.

Através da Figura 48 é visível no grupo *CaP_{Peptideo}* em (a) 5h e (b) 6h, em menor aumento, a precipitação concêntrica tentando propor a arranjo de aglomerados.

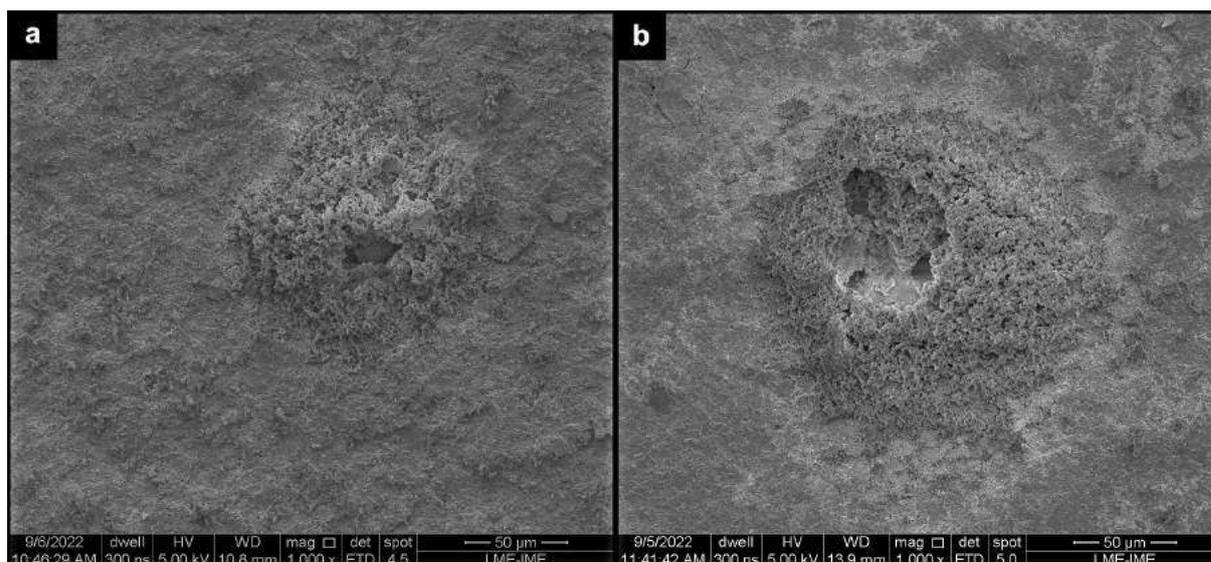


Figura 48 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 5h - 1.000x, (b) 6h - 1.000x.

Através da Figura 49 é identificado o período de 24h em diferentes magnificações, no qual é possível ver uma precipitação concêntrica em aspecto “montanhoso”; em (c) e (d) é nítido a linha de interseção entre pastilha e começo de precipitação e aglomeração.

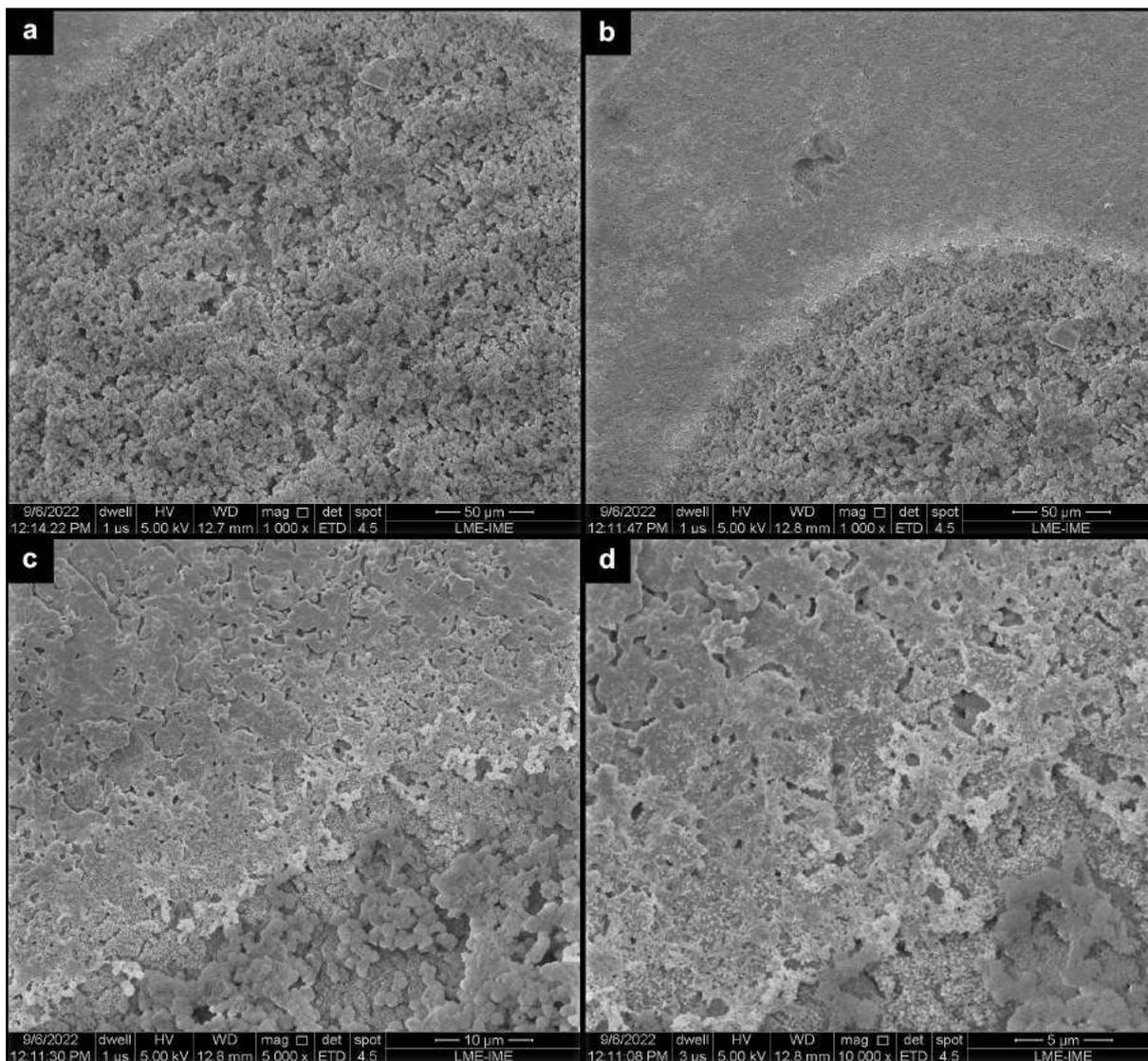
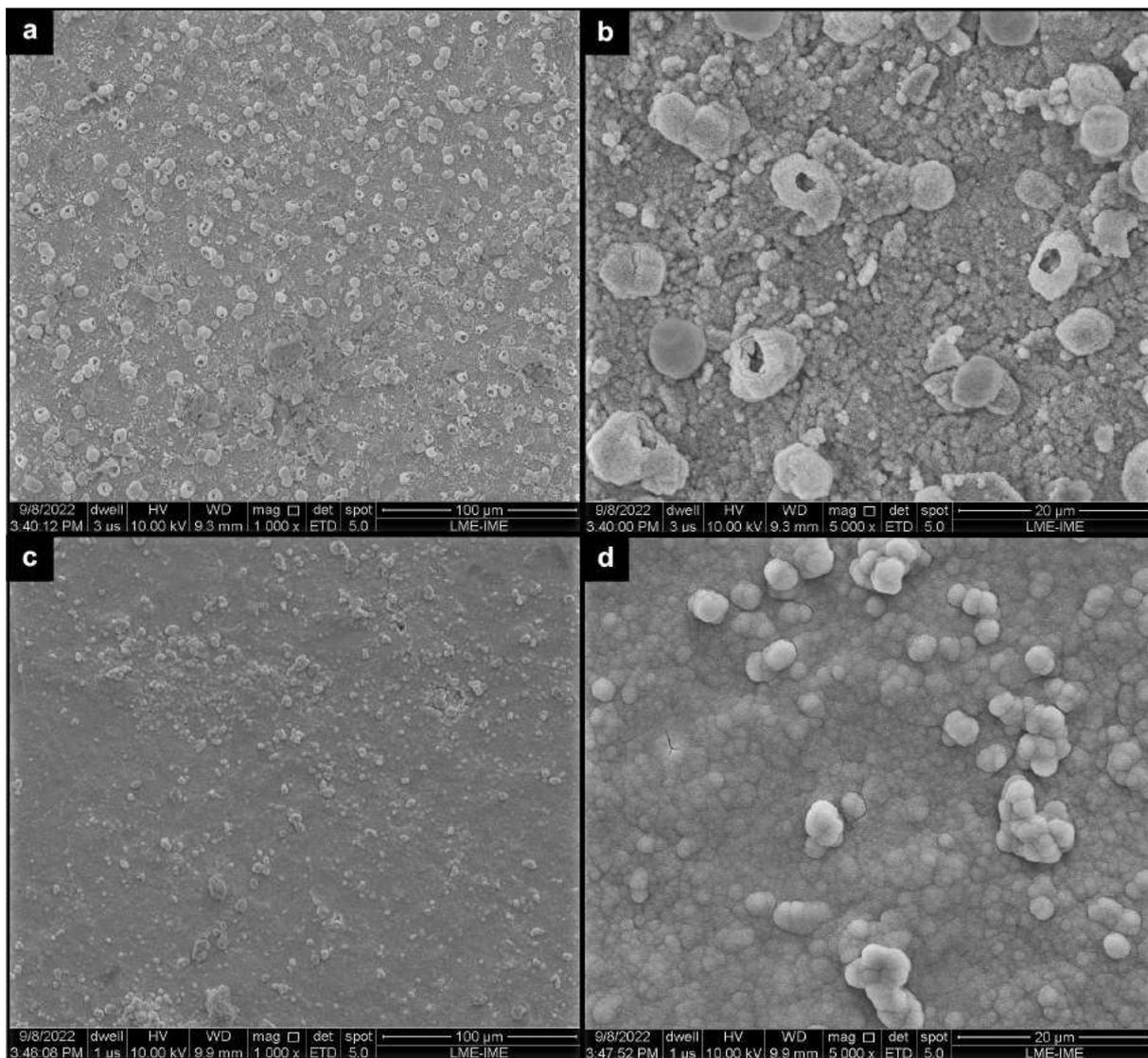
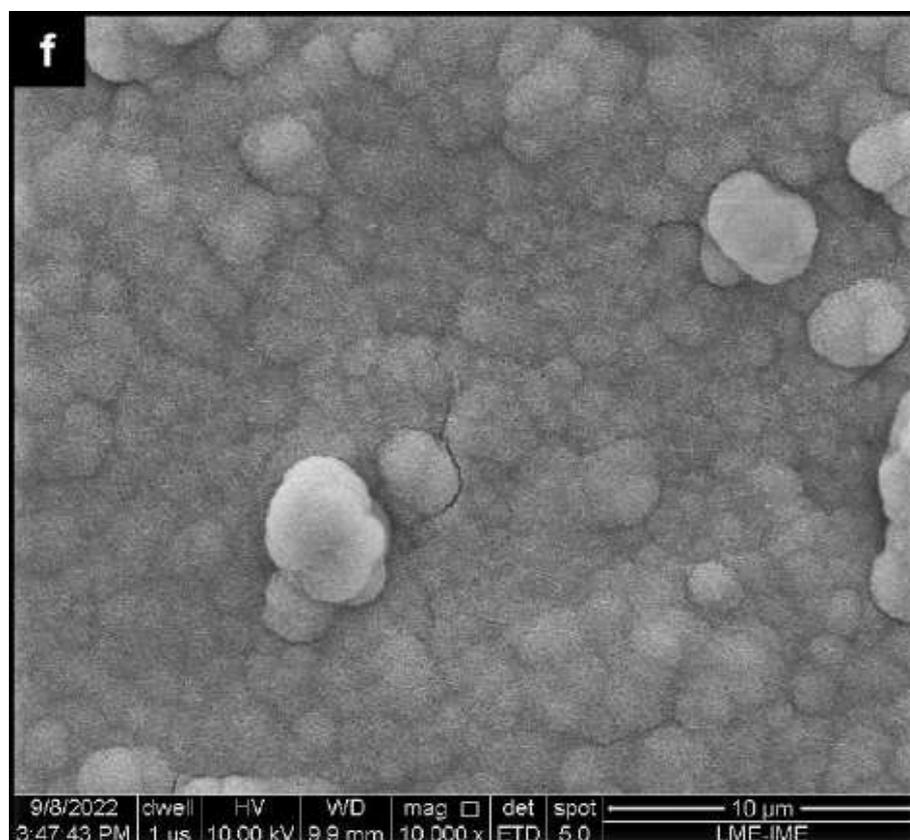
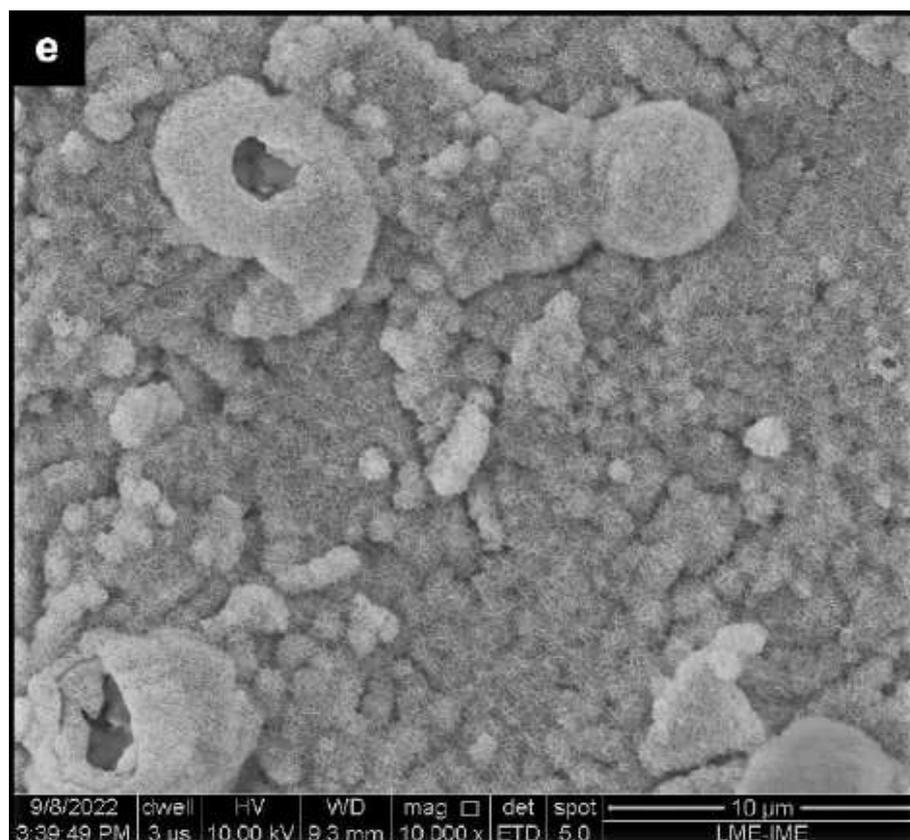


Figura 49 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 24h - 1.000x, (b) 24h - 1.000x, (c) 24h - 5.000x, (d) 24h - 10.000x.

Na Figura 50 é identificado o período de 24h em (a) e (b), e 72h em (c) e (d), ambos em aumentos menores. Em 24h é possível observar toda a superfície recoberta por *bone like apatite* com a presença de glóbulos esféricos bem definidos; enquanto que em 72h é conservado esse aspecto, contudo há uma compactação das esferas pois estas diminuem de tamanho e são recobertas por novas camadas de precipitação dando aspecto de estruturas mais “macias” e com formação de aglomerados.



Esses aspectos ficam melhor visíveis em (e) 24h e (f) 72h, ambos em magnificações maiores. No qual em 24h é expressado com clareza o aspecto e impressão de *bone like apatite* em formato de glóbulos esféricos e aglomerados.



Em maiores magnificações nota-se em 24h (g) e (h) e em 72 (i) e (j) o aspecto "agulhado" de *bone like apatite*.

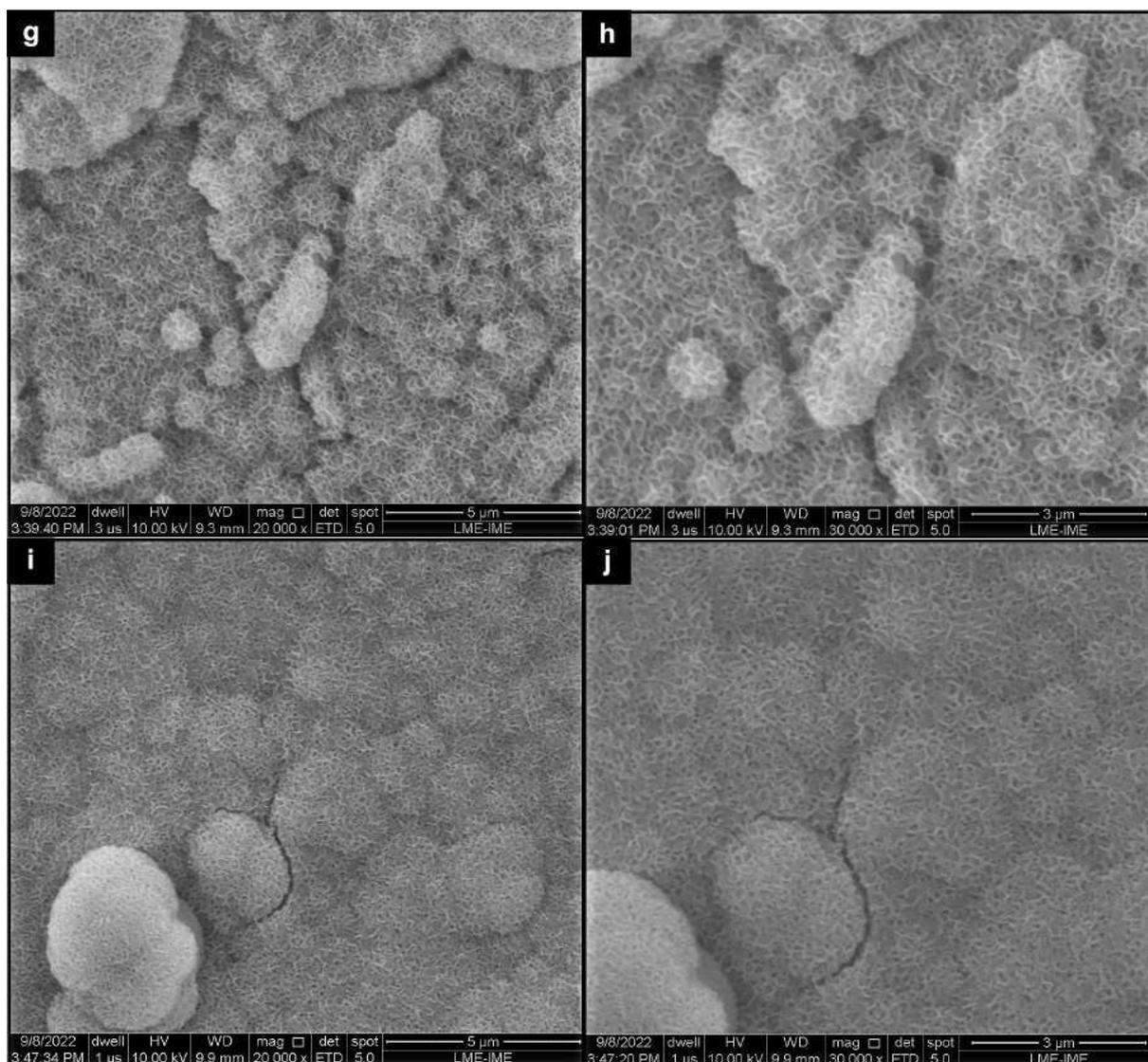


Figura 50 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 24h - 1.000x, (b) 24h - 5.000x, (c) 72h - 1.000x, (d) 72h - 5.000x, (e) 24h - 10.000x, (f) 72h - 10.000x, (g) 24h - 20.000x, (h) 24h - 30.000x, (i) 72h - 20.000x, (j) 72h - 30.000x.

Além disso, através da Figura 51 se pode notar a presença de aglomerados esféricos por toda a superfície.

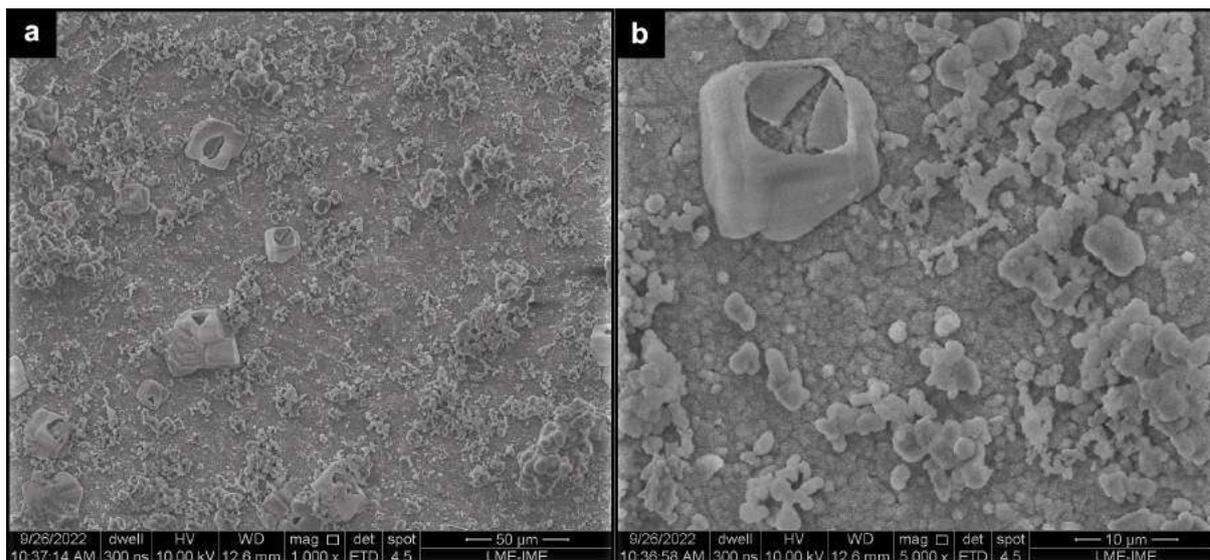
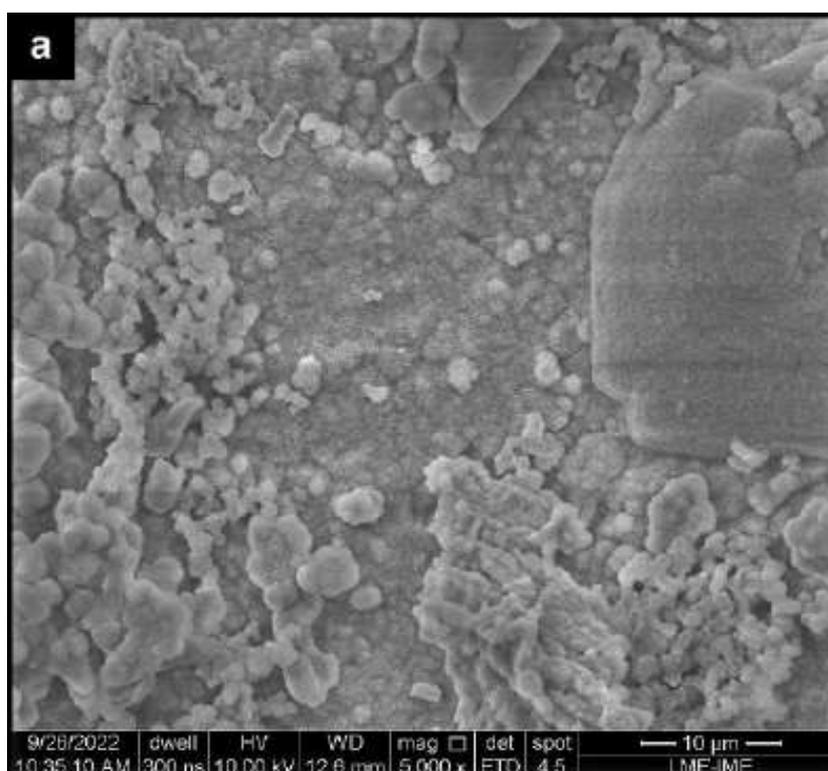


Figura 51 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP do grupo Peptídeo. (a) 336h - 1.000x, (b) 336h - 1.000x.

Na Figura 52 a evidenciação, em maiores aumentos, de aglomerados, também no período de 336h. pode notar a presença de aglomerados esféricos por toda a superfície; em (a) e (b) toda superfície recoberta por *bone like apatite* e presença de aglomerados esféricos de diferentes tamanhos; (c) é expressivo o formato "agulhado", característico, da *bone like apatite*.



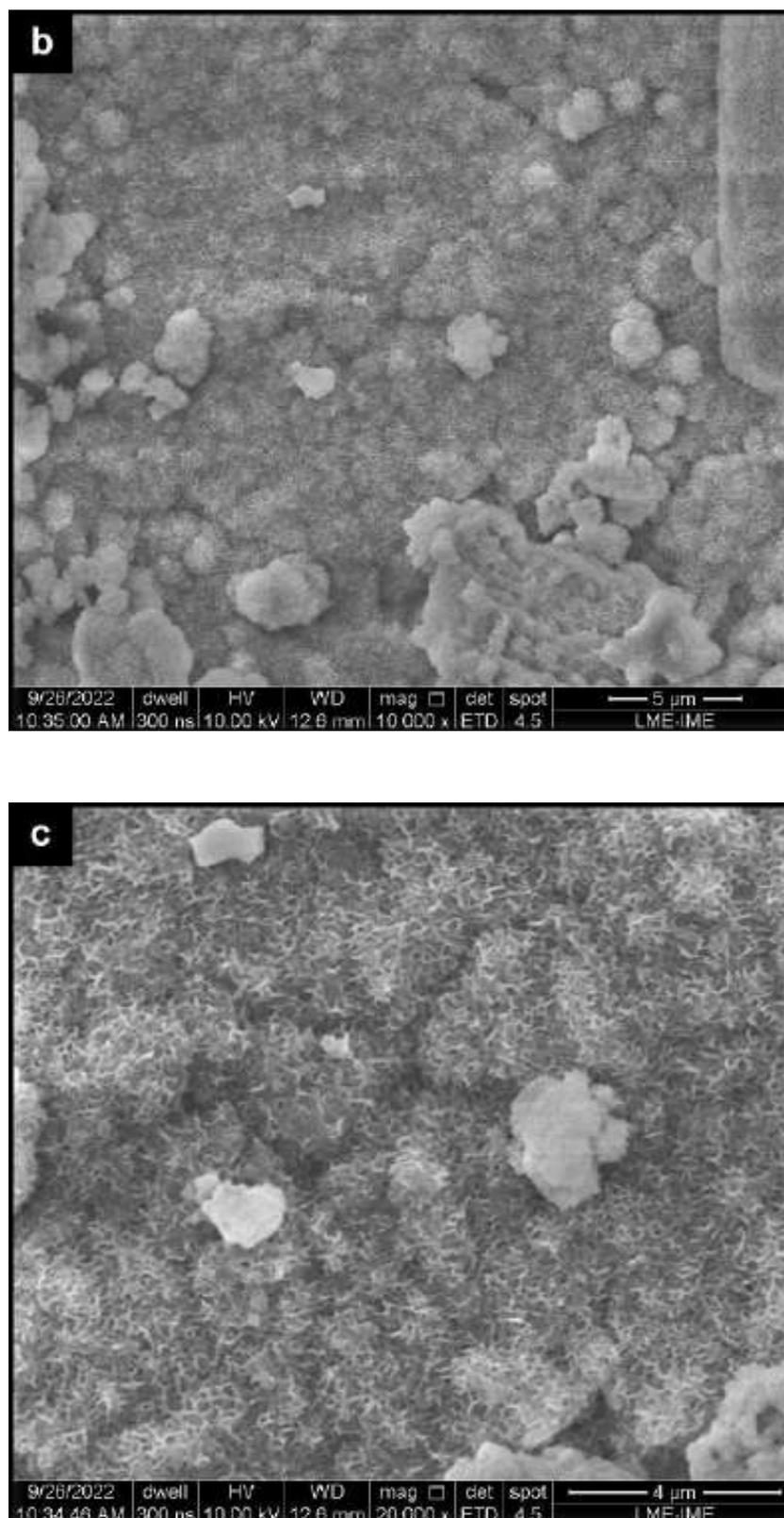


Figura 52 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 336h - 5.000x, (b) 336h - 10.000x, (c) 336h - 20.000x.

Na Figura 53 apresenta um conjunto de aglomerados esféricos no período de 336h em diferentes magnificações.

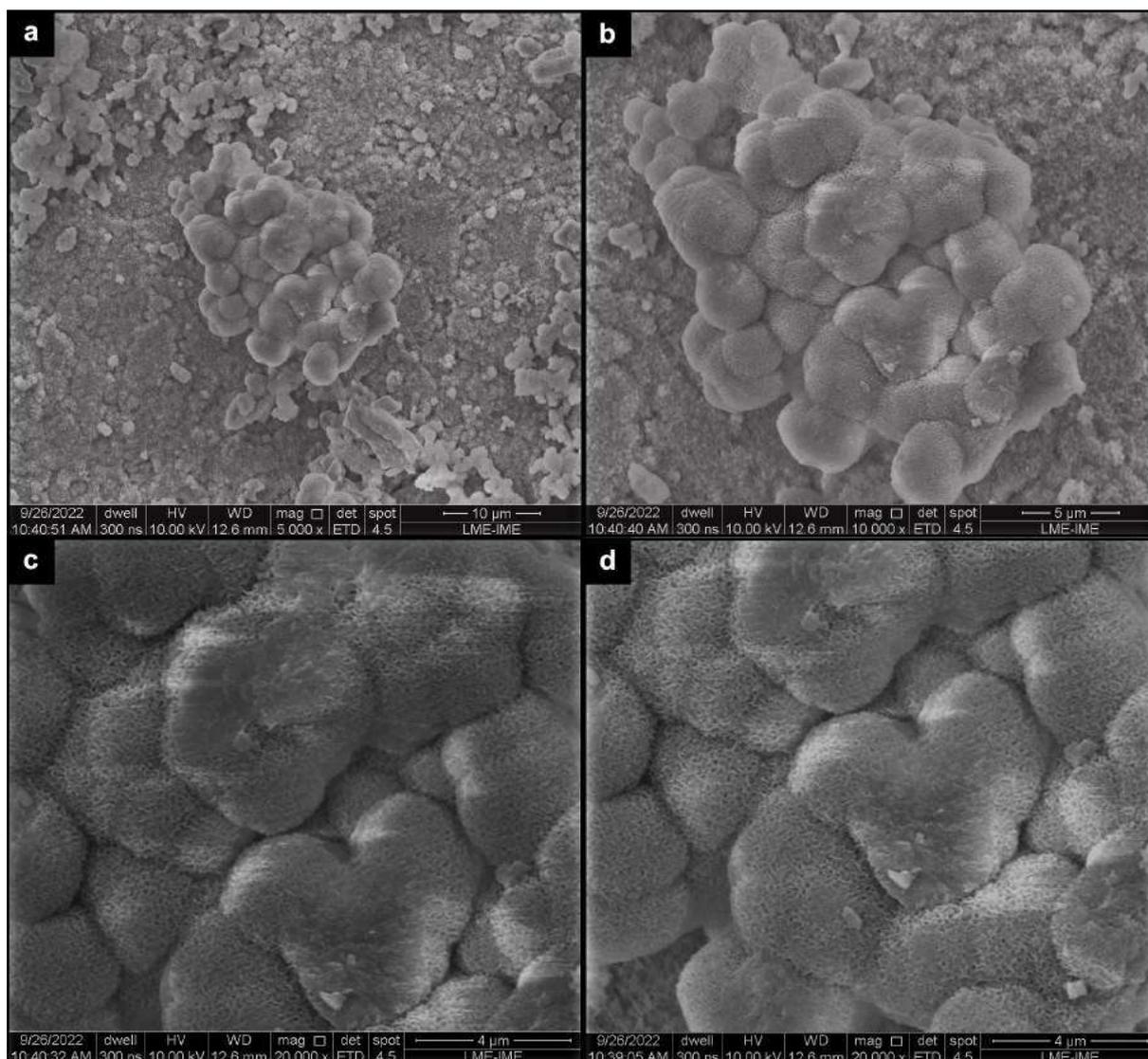
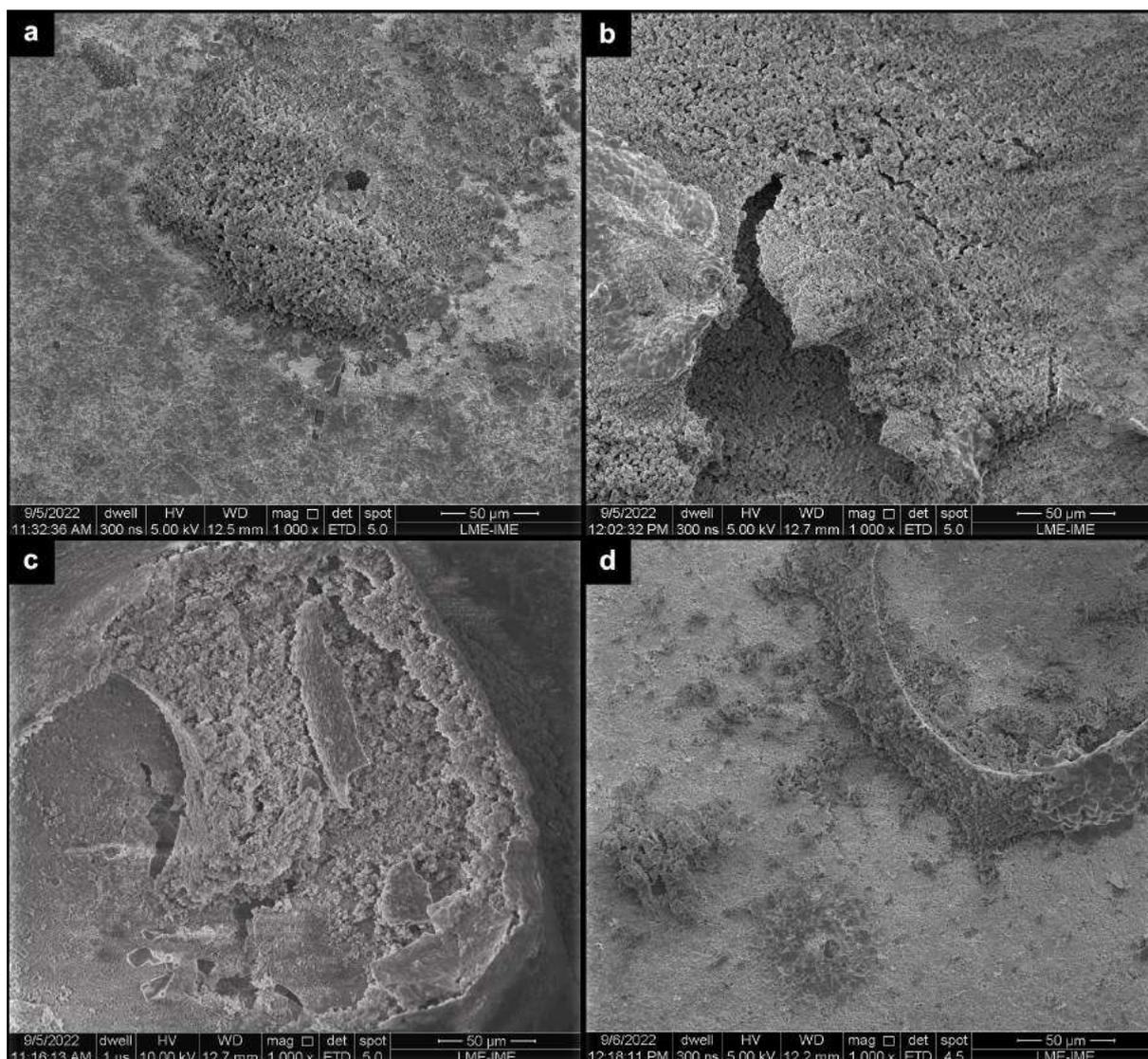
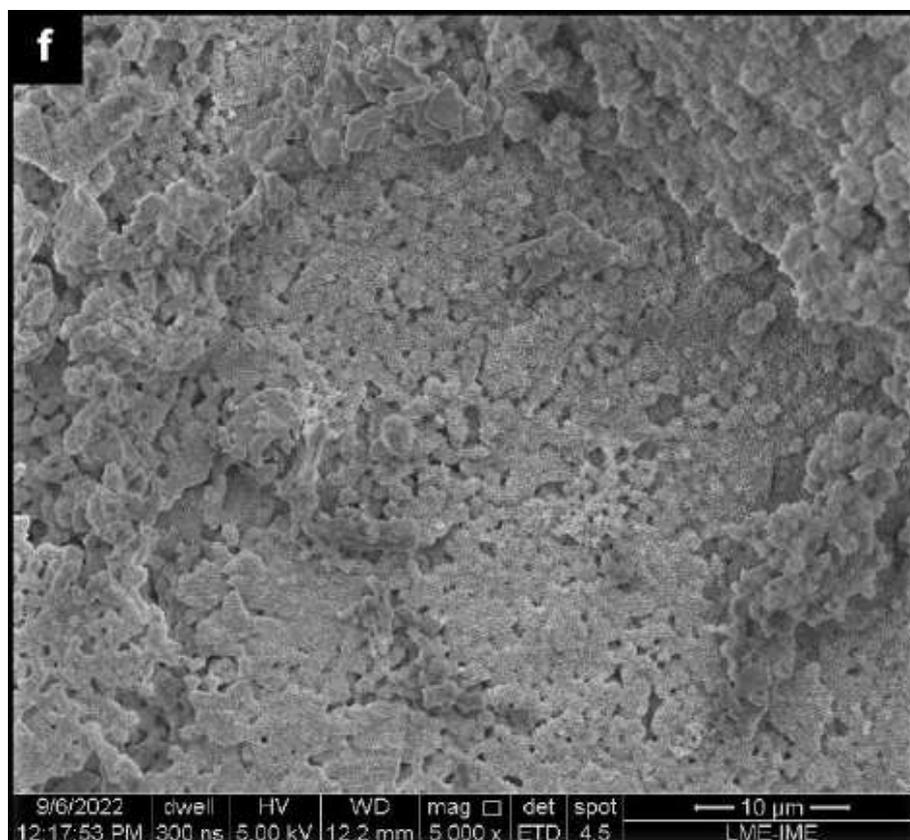
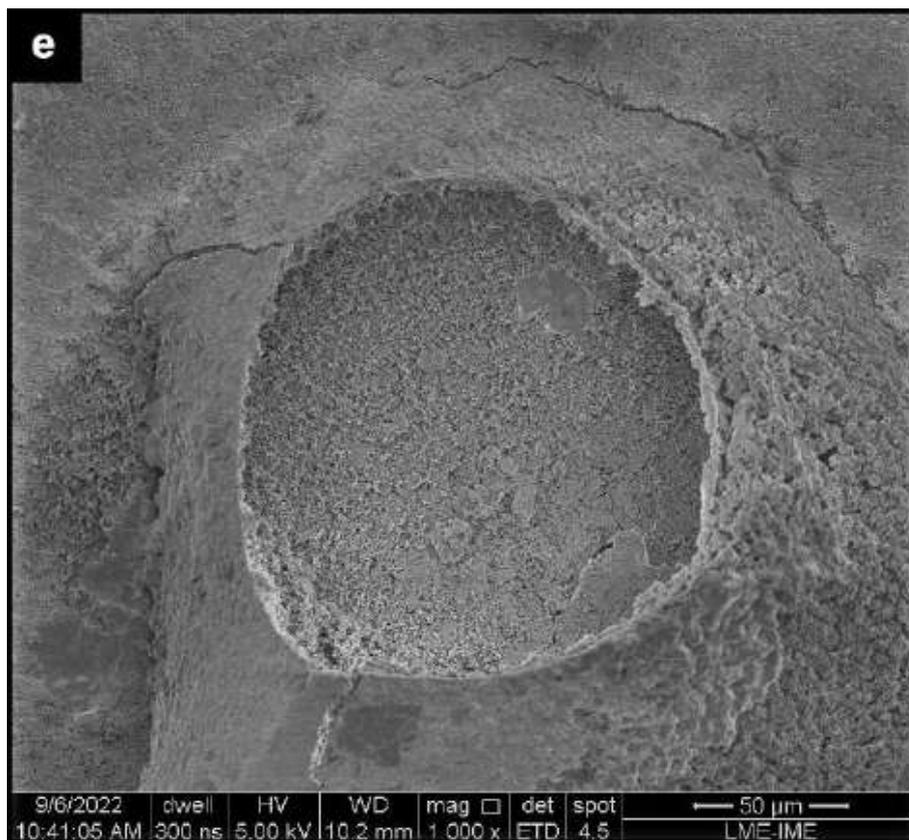


Figura 53 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP funcionalizadas com o Peptídeo. (a) 336h - 5.000x, (b) 336h - 10.000x, (c) 336h - 20.000x, (d) 336h - 20.000x.

Através da Figura 54 é visível no grupo CaP_{PBS} em (a) 3h, (b) 4h, (c) 5h e (d) 6h, em menor aumento, é possível observar um padrão de precipitação de fora para dentro como se estivesse margeando uma estrutura maior, evidenciando, também um aspecto “montanhoso”.



O período 24h é apresentado (e), (f) e (g) em maiores aumentos, é possível observar um padrão de precipitação de fora para dentro como se estivesse margeando uma estrutura maior, evidenciando melhor o aspecto “montanhoso” mas com um espaço central com ausência de aglomerações, embora possa ser visto o recobrimento basal de *bone like apatite*.



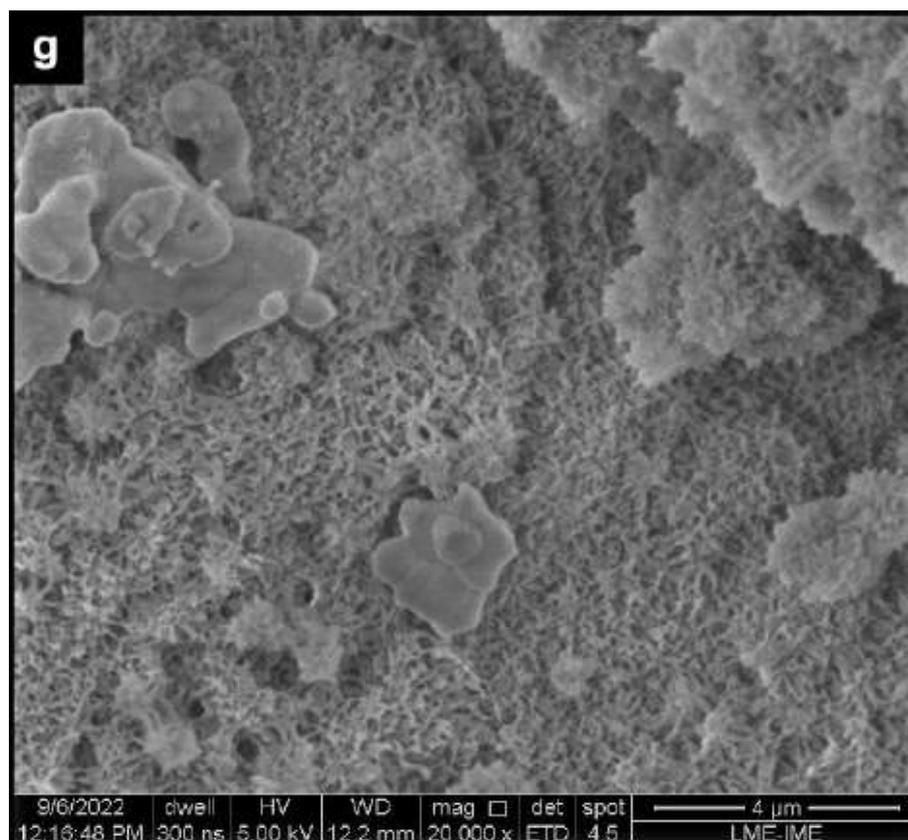
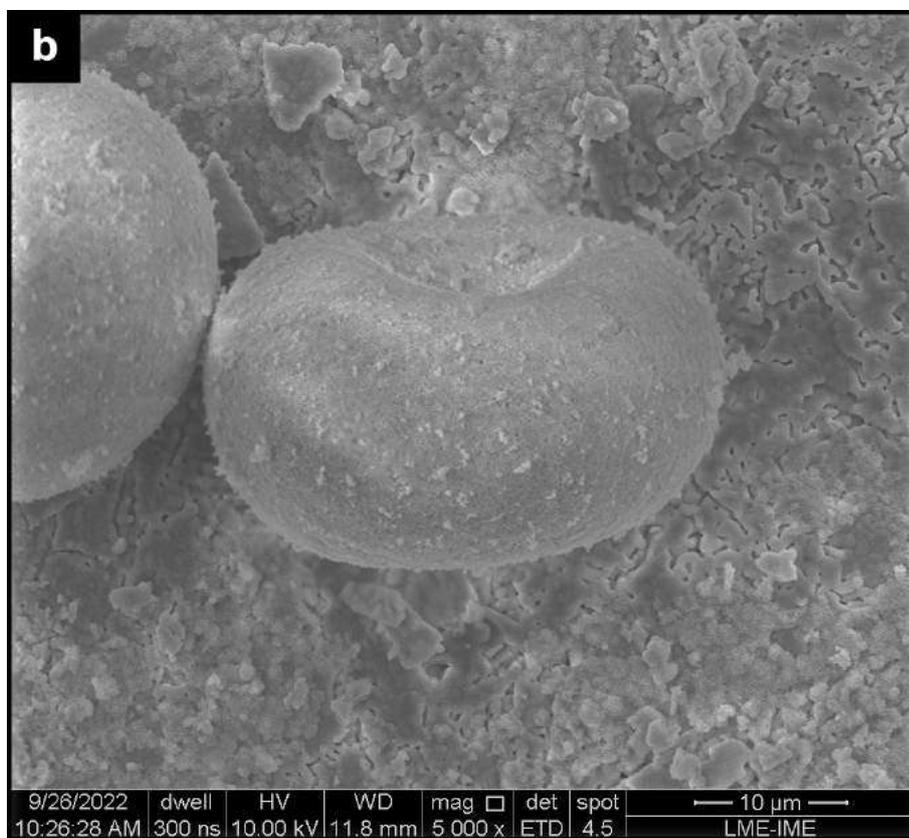
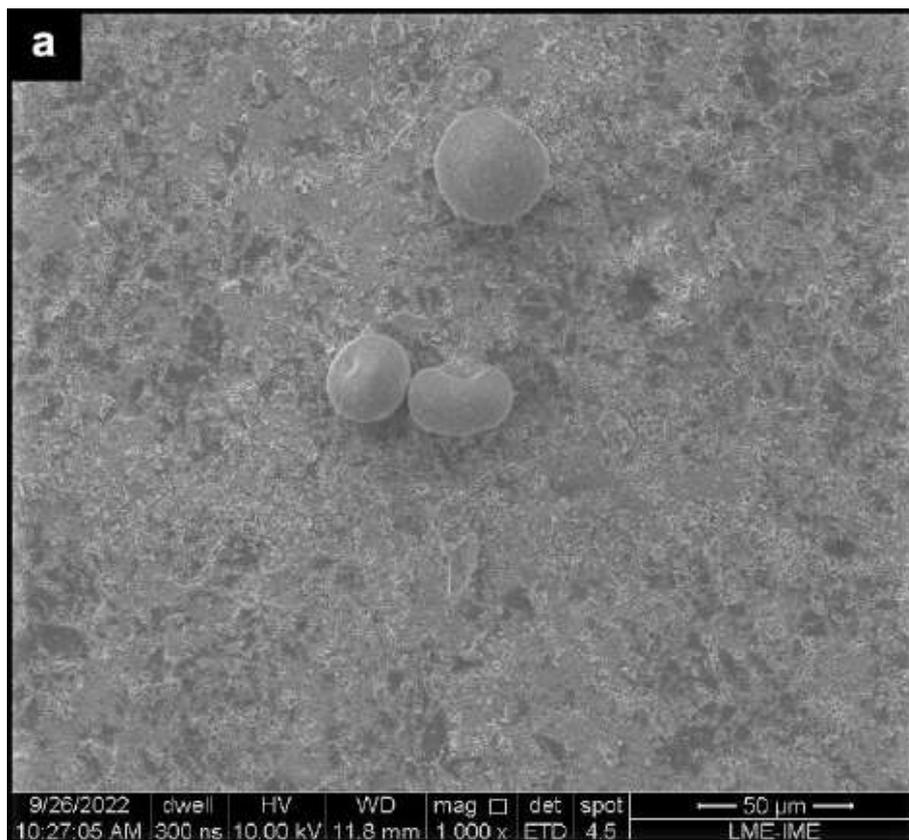


Figura 54 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP no meio PBS. (a) 3h - 1.000x, (b) 4h - 1.000x, (c) 5h - 1.000x, (d) 6h - 1.000x, (e) 24h - 1.000x, (f) 24h - 5.000x, (g) 24h - 20.000x.

Além disso, através da Figura 55 é possível identificar no período de 336h, em diferentes magnificações, a presença de algumas esferas na superfície da pastilha. Como se o padrão de precipitação do grupo CaP_{PBS} seguisse a estruturação em aspecto “montanhoso” fosse um padrão de precipitação centrípeta tentando formar uma estrutura maior. E possivelmente, essas estruturas esféricas estão ocultas por dentro, devido ao padrão de precipitação começar com uma região oval “vazia”.



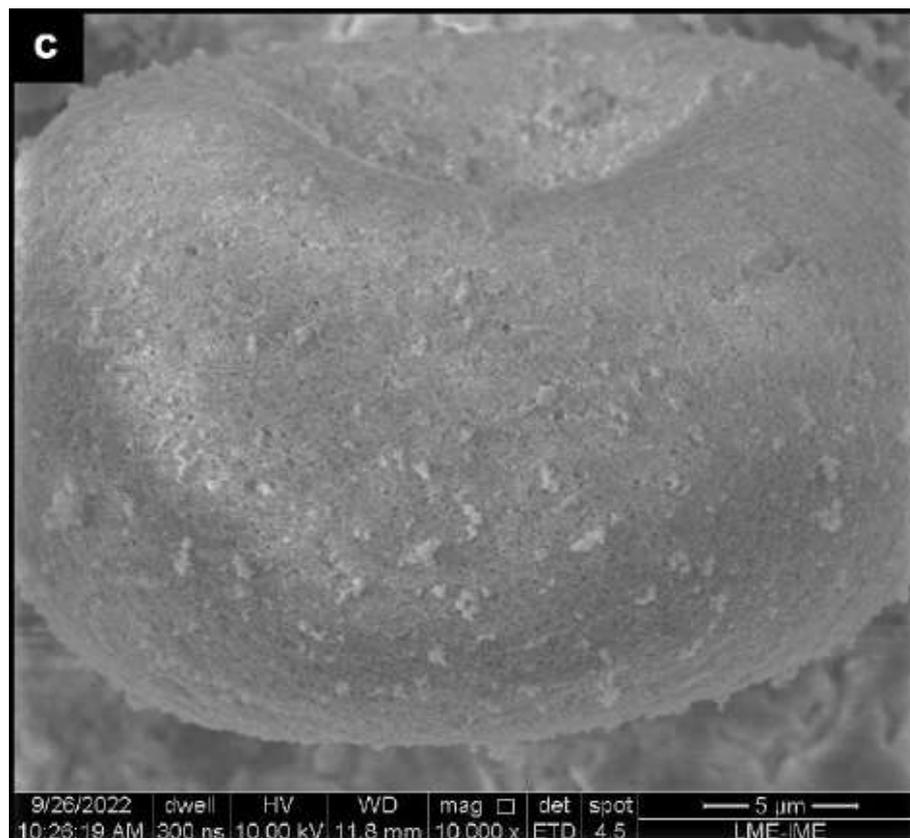


Figura 55 – Padrão de Precipitação das pastilhas de HA/TCP no meio PBS. (a) 336h - 1.000x, (b) 336h - 5.000x, (c) 336h - 10.000x.

Sendo assim, é possível indicar algumas observações para todos os grupos. Por exemplo, no grupo controle positivo, CaP , é identificado a presença de algumas regiões, mesmo que poucas, com aspecto de placas (Figura 34) e algumas possíveis precipitações (Figura 33).

Essas placas se tornam muito mais bem definidas e espessas com a progressão de tempo. Nesse sentido, essas mesmas placas também foram encontradas no grupo com o peptídeo ($CaP_{Peptideo}$) (Figura 42).

Com base em todas as micrografias até agora, se pode inferir que no grupo $CaP_{Peptideo}$ os precipitados se agregam e estruturam em esferas menores que se associam formando aglomerados maiores (Figura 50). Enquanto no grupo CaP_{PBS} parece que os precipitados se associam formando uma estrutura maior com aspecto esférico (Figura 55).

Isso só se torna nítido com uma magnitude menor. No primeiro parece que as esferas são densas e estão preenchidas, pelos próprios aglomerados, já no segundo a ideia é que foi feito um revestimento convexo e a estrutura esférica maior está oca.

Além disso, um aspecto morfológico muito interessante, para a aplicação biomédica dos biomateriais, é a porosidade. De modo que o grupo $CaP_{Peptideo}$ se apresenta com um

arranjo sugestivo de poros melhor definidos e estruturados do que o grupo CaP_{PBS} .

Esses resultados são compatíveis com os resultados já descritos, anteriormente, na literatura de estudos *in vitro* tanto para HA (SILVA; SOMBRA, 2010) como para precipitados (ZADPOOR, 2014; KIM et al., 2005). Além disso, os resultados confirmam também a atividade potencial de biomineralização do peptídeo Ling 2020.

Nesse sentido, isso contextualiza descobertas que podem melhorar a bioatividade dos biomateriais cerâmicos para aplicações médicas e dentárias. Isso ao nível da atividade de gênese interagindo com células de tecido ósseo ou cartilaginoso (formação e remodelação de tecidos); indução com interação com células mesenquimais (neoformação de tecidos onde não há tecido); e condução, que seria, precisamente, a promoção da biomineralização nos tecidos remanescentes no envolvimento celular (neoformação de tecidos) (LEGEROS, 2008; SINHORETI; VITTI; SOBRINHO, 2013).

5.3.2 **Caracterização Físico-química das Pastilhas Bifásicas de Hidroxiapatita e Fosfato Tricálcico submetidas ao teste de bioatividade**

A Figura 56 mostra os três grupos, sendo eles: CaP (pastilhas somente em meio McCoy), $CaP_{Peptideo}$ (pastilhas com peptídeo solubilizado, com PBS, em meio McCoy), CaP_{PBS} (pastilhas em meio PBS apenas).

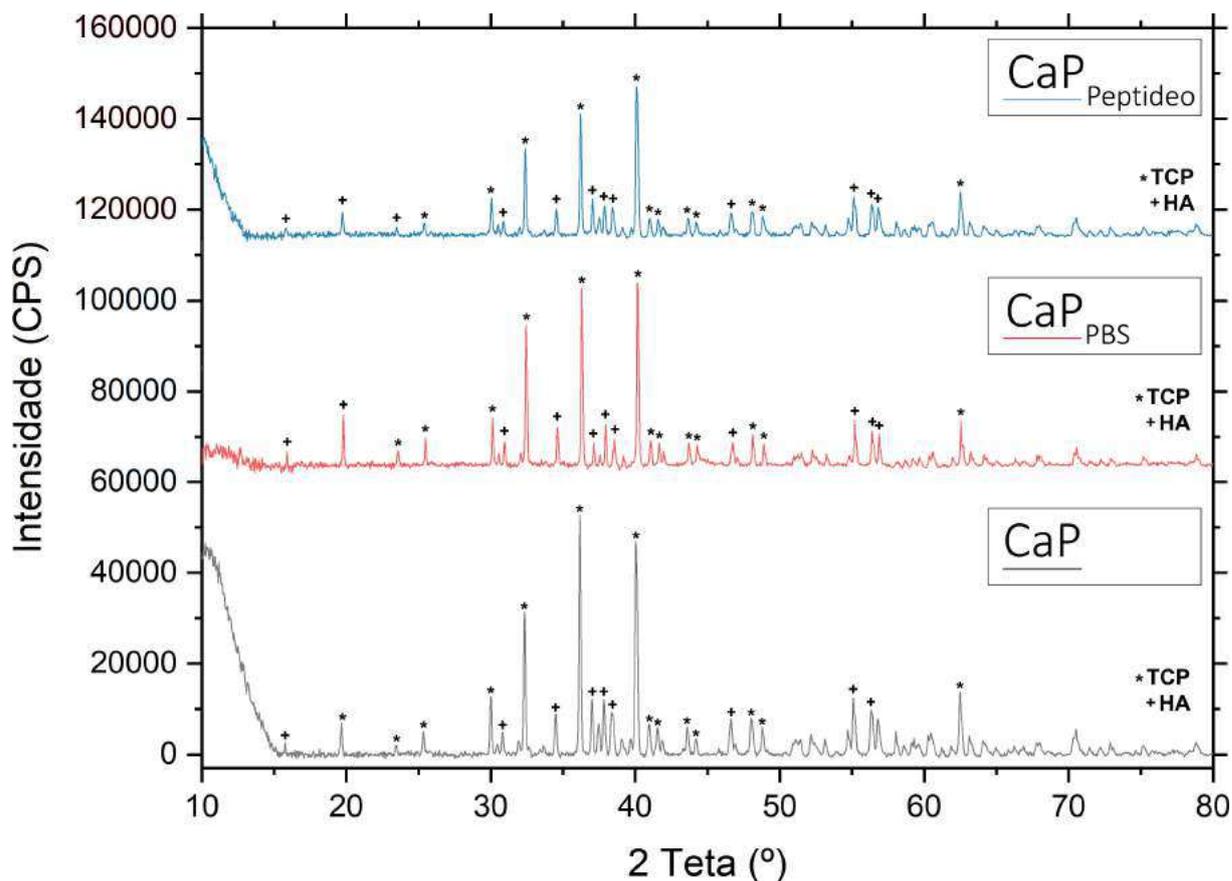


Figura 56 – Difratoograma das Pastilhas de Hidroxiapatita/Fosfato Tricálcico submetidas ao Teste de Bioatividade.

Os difratogramas dos grupos de bioatividade seguem o mesmo padrão da $CaP_{Sinterizada}$, com picos maiores, melhor definidos, e com menor *background* (alta cristalinidade) e identificando a presença das fases HA e TCP, designando uma pastilha bifásica.

Nesse sentido, também foram analisadas as espectroscopias dos grupos referentes ao teste de bioatividade: CaP , $CaP_{Peptideo}$, CaP_{PBS} (Figura 57 e 58).

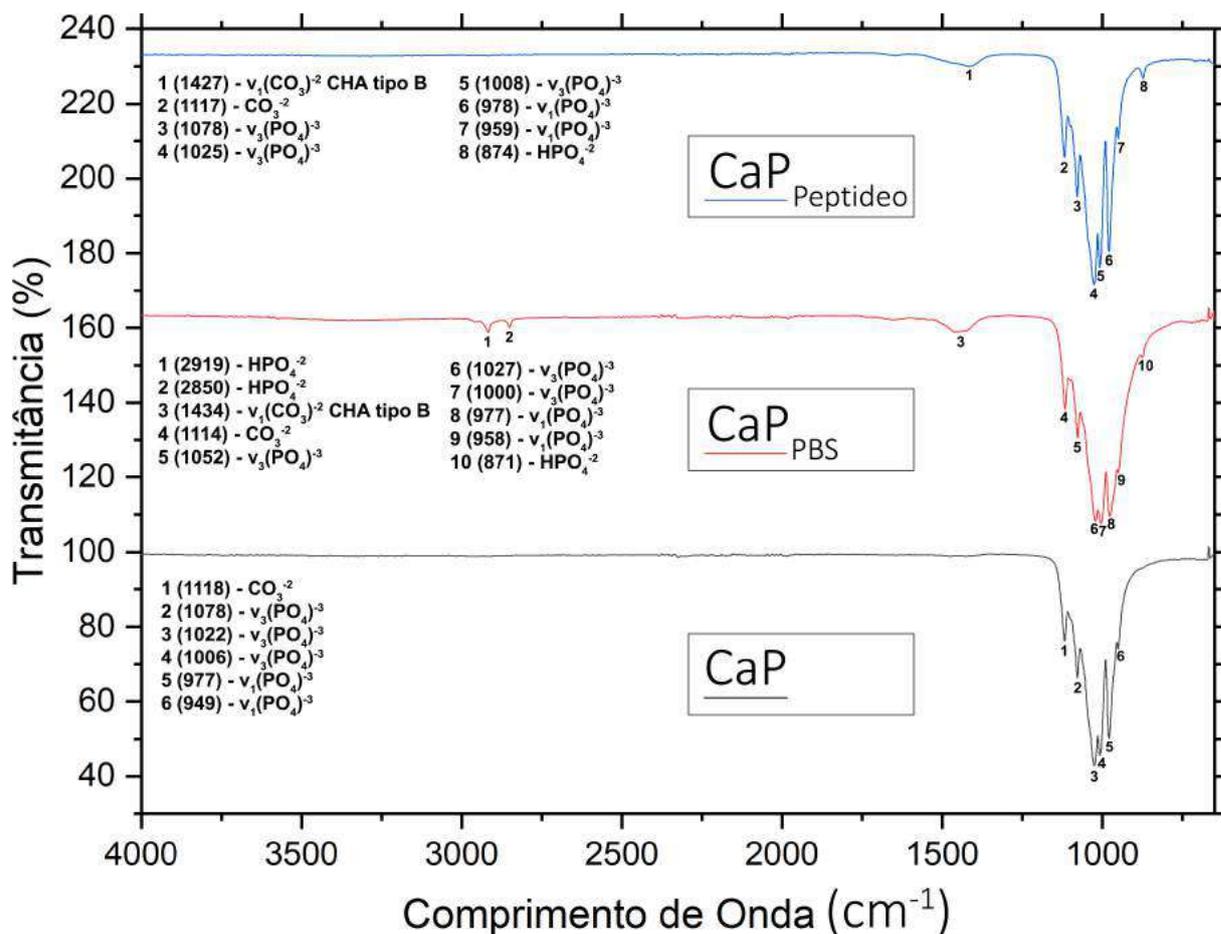


Figura 57 – Espectroscopia de Infravermelho de Transformada de Fourier dos Grupos do Teste de Bioatividade.

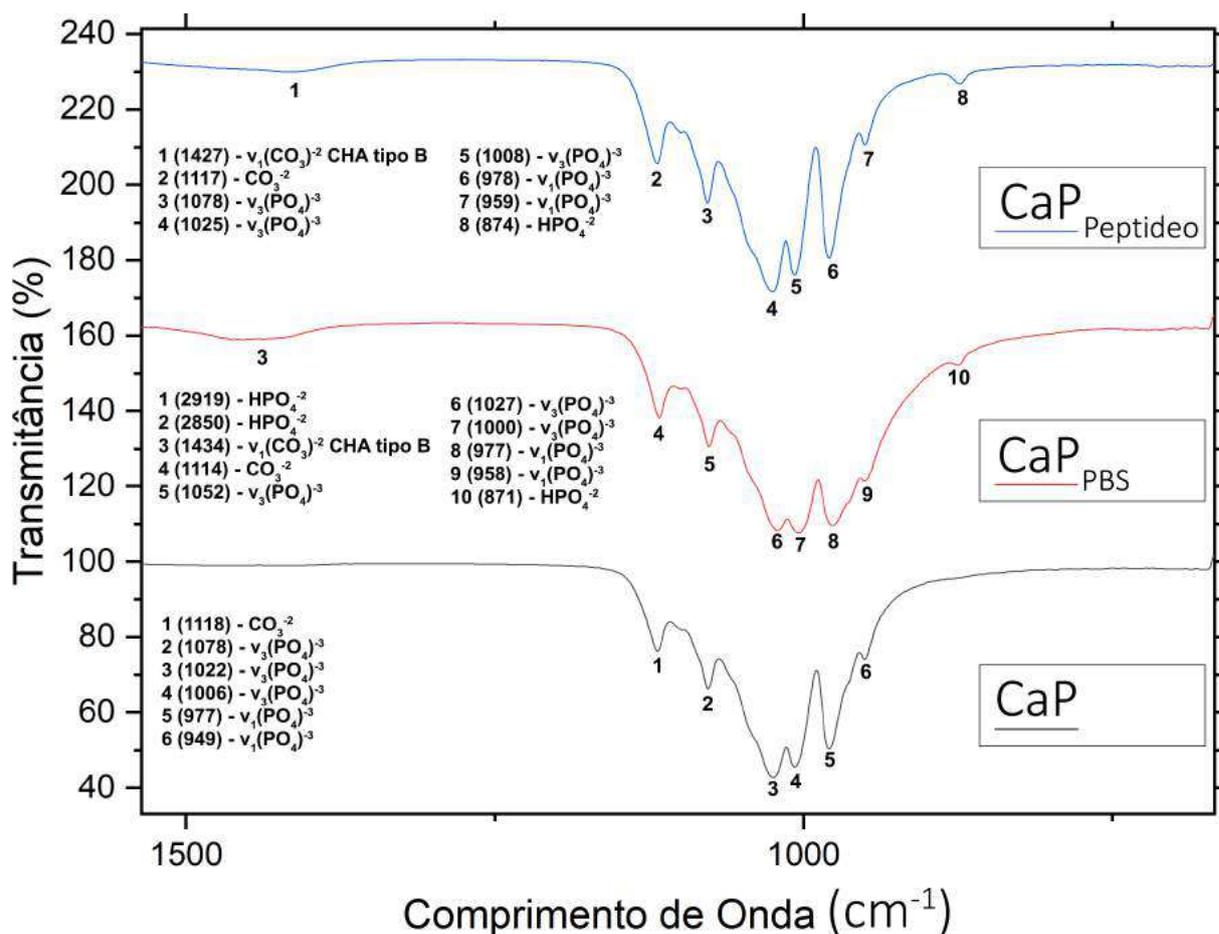


Figura 58 – Espectroscopia de Infravermelho de Transformada de Fourier dos Grupos do Teste de Bioatividade.

O grupo CaP segue os mesmos padrões e interpretações referentes ao $\text{CaP}_{\text{Sinterizada}}$. Sendo assim, o espectro relativo ao $\text{CaP}_{\text{Peptideo}}$ exhibe a banda 1427cm^{-1} em um modo de estiramento $\nu_1(\text{CO}_3)^{-2}$ de CHA tipo B; as bandas 959cm^{-1} e 978cm^{-1} mostram o estiramento simétrico não degenerado $\nu_1(\text{PO}_4)^{-3}$; e as bandas 1078cm^{-1} , 1025cm^{-1} e 1008cm^{-1} identificam o modo vibracional $\nu_3(\text{PO}_4)^{-3}$ (estiramento não simétrico degenerado). A região 1117cm^{-1} mostra o grupamento de $[\text{CO}_3^{-2}]$, o que identifica imperfeições cristalinas na HA não estequiométrica, enquanto que a região 874cm^{-1} mostra um modo de flexão (ν_4 ou ν_3) do grupamento $[\text{CO}_3^{-2}]$.

O grupo de pastilhas CaP_{PBS} identifica nas bandas 2919cm^{-1} e 2850cm^{-1} , o modo de estiramento simétrico (ν_5), da ligação P-O(H) do grupo HPO_4^{-2} ; em 1427cm^{-1} é identificado um modo de estiramento $\nu_1(\text{CO}_3)^{-2}$ do CHA tipo B, enquanto que em 1114cm^{-1} é mostrado o grupamento de $[\text{CO}_3^{-2}]$ identificando imperfeições cristalinas da HA não estequiométrica; as bandas 1052cm^{-1} , 1027cm^{-1} e 1000cm^{-1} identificam o modo vibracional $\nu_3(\text{PO}_4)^{-3}$ (estiramento não simétrico degenerado); as bandas 959cm^{-1} e 978cm^{-1} mostram o alongamento simétrico não degenerado $\nu_1(\text{PO}_4)^{-3}$; enquanto que no

871cm^{-1} mostra um modo de flexão (ν_2) do grupo $[\text{CO}_3^{-2}]$.

A partir disso, é possível perceber que a análise de FTIR desses grupos confirmam os resultados da DRX, no qual existe a presença tanto de HA quanto de TCP, confirmando o resultado que as pastilhas são bifásicas. Além disso, é indicado no FTIR a presença de grupos substitutos de carbonato $[\text{CO}_3^{-2}]$ nas estruturas das amostras de $\text{CaP}_{\text{Peptideo}}$ e CaP_{PBS} , sugerindo assim a presença de precipitados. A Tabela 14 resume os resultados do FTIR.

Tabela 14 – Resultados da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

	Grupamentos	Número de Ondas (cm^{-1})
CaP	PO_4^{-3}	949, 977, 1006, 1022 e 1078
	CO_3^{-2}	1118
$\text{CaP}_{\text{Peptideo}}$	PO_4^{-3}	959, 978, 1008, 1025 e 1078
	CO_3^{-2}	874, 1117 e 1427
CaP_{PBS}	HPO_4^{-2}	2850 e 2850
	PO_4^{-3}	159, 978, 1000, 1027 e 1052
	CO_3^{-2}	871, 1114 e 1427

Esses resultados são confirmados pelos resultados já encontrados na literatura (RIBEIRO et al., 2021; ROCHA et al., 2017; KOUTSOPOULOS, 2002). Além disso, as bandas em 1144cm^{-1} , 1126cm^{-1} , 990cm^{-1} , 970cm^{-1} , e 945cm^{-1} são mais características do TCP, enquanto as bandas 1154 , 1087cm^{-1} , 1046cm^{-1} , 1032cm^{-1} , 962cm^{-1} são mais identificáveis de HA (KOUTSOPOULOS, 2002). Em geral, esses intervalos são correspondentes à região mais intensa dos espectros, e correspondem, aproximadamente, a $1118\text{-}949\text{cm}^{-1}$, identificando a vibração dos grupos de fosfato $\nu_3(\text{PO}_4)^{-3}$, característica tanto da HA, quanto do TCP (ROCHA et al., 2017).

5.4 Teste de Citotoxicidade Indireta

O teste citotoxicidade indireta demonstra o resultado estatístico da viabilidade celular, indicando que, após a exposição das células tronco mesenquimais de polpa dentária aos extratos dos biomateriais por 24 horas e 48 horas, não foi observada citotoxicidade (Figura 59).

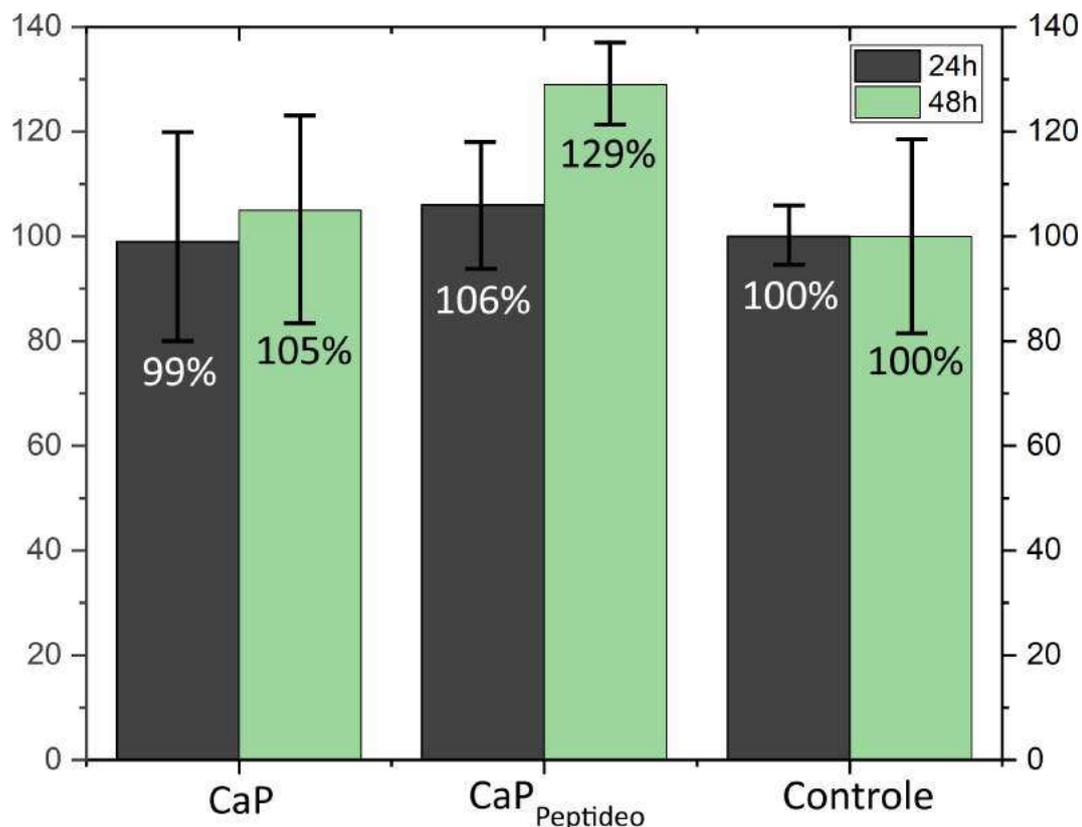


Figura 59 – Teste de Viabilidade em Células Tronco Mesenquimais da Polpa Dentária.

Os valores de viabilidade celular (%) para os grupos *CaP* e *CaP_{Peptideo}* se apresentaram como 99% e 106%, respectivamente, após 24h. Após 48h, os resultados de viabilidade foram de 105% e 129%, respectivamente. Esses valores são indicativos da intensidade da absorvância e sugerem um alto número viável de células durante o ensaio, quando comparado ao grupo controle.

Assim, os resultados do ensaio WST-1 sugerem que tanto os grupos *CaP* e *CaP_{Peptideo}* demonstram uma elevada viabilidade celular após 48 horas, o que sugere que a funcionalização com o peptídeo é uma alternativa promissora para as atividades de biomineralização (gênese, indução e condução) em tecidos mineralizados. Além disso, não foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, entre os grupos ($p > 0,05$). Esses resultados são compatíveis com os resultados encontrados para HA (MEALY; O'KELLY, 2012).

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo, a biomineralização do HBP foi avaliada pelo teste de bioatividade no meio de cultura McCoy. Assim, a funcionalização das pastilhas bifásicas de HA/TCP com HBP provou ser uma forma eficaz de promover a precipitação de *bone like apatite* em amostras de CaP, isso a nível de atividade biológica de condução. Assim, o grupo experimental com o peptídeo se apresenta com uma interação de resposta de biomineralização com progressão melhor quando comparado aos demais grupos (controles positivos).

O teste de citotoxicidade indireta confirma o efeito biológico, de funcionalização, da HA/TCP com HBP, na biomineralização, como biocompatível e não citotóxico, mostrando um alto número de células viáveis compatíveis com as atividades de interação tecido-biomaterial, ou seja tanto as pastilhas bifásicas de HA/TCP quanto o peptídeo apresentam e permitem a viabilidade celular.

Os resultados do FTIR confirmaram a presença de grupos de substituição como os carbonatos, sugerindo a presença de precipitação, confirmando os resultados do DRX. Além disso, a análise pelo MEV-FEG identifica presença de *bone like apatite* no grupo funcionalizado com o peptídeo e no que estava somente em meio PBS, sugerindo padrões de precipitações diferentes. O primeiro como um conjunto de precipitações se agregando formando glóbulos esféricos pequenos, enquanto o segundo essas precipitações se aglomeram para formar uma estrutura globular esférica maior.

7 LIMITAÇÕES E SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

- Como limitação principal, fica evidente, a ausência de análise química para quantificar a absorvância do peptídeo nas pastilhas bifásicas de HA/TCP;
- A identificação dos grupamentos funcionais do peptídeo;
- Colocar as pastilhas submersas na solução do peptídeo ao invés de depositar uma pequena quantidade na superfície;
- Quantificação das fases pelo Refinamento de Rietveld;
- Como possível aplicação poderia ser considerado a deposição do peptídeo na superfície de implantes de titânio.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBRISO 23317*: Implantes para cirurgia - avaliação *in vitro* para a capacidade de formação de apatita dos materiais de implantes. Rio de Janeiro, 2017. 15 p.
- BALOGH, M.; FEHRENBACH, M. *Anatomia, Histologia e Embriologia ds Dentes e das Estruturas Orofaciais*. 3. ed. [S.l.]: Editora Elsevier, 2012.
- BASTOS, I.; ANDRADE, M.; SILVA, R.; SOARES, G. Análise termodinâmica da fluoretação da hidroxiapatita no sistema $ca - p - f - h_2o$ a $37^{\circ}c$. *Educ. Tecnol.*, v.6, n.1/2, p. 14–17, 2001.
- CAMPODONI, E.; DOZIO, S.; PANSERI, S.; MONTESI, M.; TAMPIERI, A.; SANDRI, M. Mimicking natural microenvironments: Design of 3d-aligned hybrid scaffold for dentin regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*, v.8, n.836, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00836. PMID: 32793577; PMCID: PMC7390955.
- CHEN, Z.; CAO, S.; WANG, H.; LI, Y.; KISHEN, A.; DENG, X.; YANG, X.; WANG, Y.; CONG, C.; WANG, H.; ZHANG, X. Biomimetic remineralization of demineralized dentine using scaffold of cmc/acp nanocomplexes in an in vitro tooth model of deep caries. *PLoS One*, v.10, n.1, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0116553. PMID: 25587986; PMCID: PMC4294661.
- CHIEN, Y.; TAO, J.; SAEKI, K.; CHIN, A.; LAU, J.; CHEN, C.; YOREO, J. D. Using biomimetic polymers in place of noncollagenous proteins to achieve functional remineralization of dentin tissues. *ACS Biomaterials Science Engineering*, v.3, n.12, p. 3469–3479, 2017. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.7b00378.
- COHEN, S.; APTER, N.; JESSE, S.; KALININ, S.; BARLAM, D.; PERETZ, A.; ZISKIND, D.; WAGNER, H. Afm investigation of mechanical properties of dentin. *Isr. J. Chem.*, v.48, p. 65–72, 2008. DOI: 10.1002/term.1814.
- DOROZHKIN, S. Calcium orthophosphates (capo4): Occurrence and properties. *Morphologie*, v.101, n.334, p. 125–142, 2017. DOI: 10.1002/jemt.23183.
- DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates. *J Mater Sci.*, v.42, p. 1061–1095, 2007.
- DOROZHKIN, S. V. Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering. *Biology and Medicine. Materials*, v.2, p. 1975–2045, 2009.
- DOROZHKIN, S. V. Medical application of calcium orthophosphate bioceramics. *BIO*, v.1, p. 1–51, 2011.
- DOROZHKIN, S. V.; EPPLE, M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angewandte Chemie*, v.41, n.17, p. 3130–3146, 2002.
- EBRAHIMI, M.; BOTELHO, M.; DOROZHKIN, S. Biphasic calcium phosphates bioceramics (ha/tcp): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of

study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering: C*, v.71, p. 1293–1312, 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2016.11.039.

ELSHARKAWY, S.; AL-JAWAD, M.; PANTANO, M.; TEJEDA-MONTES, E.; MEHTA, K.; JAMAL, H.; AGARWAL, S.; SHUTURMINSKA, K.; RICE, A.; TARAKINA, N.; WILSON, R.; BUSHBY, A.; ALONSO, M.; RODRIGUEZ-CABELLO, J.; BARBIERI, E.; HERNÁNDEZ, A. D. R.; STEVENS, M.; PUGNO, N.; ANDERSON, P.; MATA, A. Protein disorder-order interplay to guide the growth of hierarchical mineralized structures. *Nat Commun.*, v.9, n.1, p. 21–45, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-04319-0. PMID: 29858566; PMCID: PMC5984621.

FAN, Y.; MORADIAN-OLDAK, Z. S. J. A controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials*, v.30, n.4, p. 478–483, 2009.

FANG, Z.; GUO, M.; ZHOU, Q.; LI, Q.; WONG, H.; CAO, C. Enamel-like tissue regeneration by using biomimetic enamel matrix proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.183, p. 2131–2141, 2021.

FERREIRA, J.; LOURO, L.; COSTA, A.; MARCAL, a. D. R. R.; BARBOSA, R.; CAMPOS, J.; SILVA, M. Zinc-doped calcium phosphate coating on titanium surface using ostrich eggshell as a Ca^{2+} ions source. *Biomaterials and Medical Applications*, v.1, p. 1, 2017.

FINCHAM, A.; MORADIAN-OLDAK, J.; SIMMER, J. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J. Struct. Biol.*, v.126, n.3, p. 270–299, 1999. DOI: 10.1006/jsbi.1999.4130. PMID: 10441532.

FONSECA, M.; CAMPOS, J.; LOURO, L.; SILVA, M. Bioceramics biphasic and triphasic scaffolds by gelcasting. *Key Engineering Materials*, v.396, p. 683–686, 2009.

GARTNER, L. *Atlas Colorido de Histologia*. 7. ed. [S.l.]: Grupo GEN, 2018.

GITIRANA, L. *Coleção Conhecendo. Histologia dos tecidos*. 1. ed. Rio de Janeiro: PUBLIT Soluções Editoriais, 2013.

GOWER, L. Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biomineralization. *Chemical Reviews*, v.108, n.11, p. 4551–4627, 2008. DOI: 10.1021/cr800443h.

GRUENBAUM-COHEN, Y.; TUCKER, A.; HAZE, A.; SHILO, D.; TAYLOR, A.; SHAY, B.; SHARPE, P.; MITSIADIS, T.; ORNOY, A.; BLUMENFELD, A.; DEUTSCH, D. Amelogenin in cranio-facial development: the tooth as a model to study the role of amelogenin during embryogenesis. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.*, v.312B, n.5, p. 445–457, 2009. DOI: 10.1002/jez.b.21255. PMID: 19097165.

GULSEREN, G.; TANSIK, G.; GARIFULLIN, R.; TEKINAY, A.; GULER, M. Dentin phosphoprotein mimetic peptide nanofibers promote biomineralization. *Biosci.*, 2019. DOI: 10.1002/mabi.201800080.

GUNGORMUS, M.; FONG, H.; KIM, I.; EVANS, J.; TAMERLER, C.; SARIKAYA, M. Regulation of in vitro calcium phosphate mineralization by combinatorially selected hydroxyapatite-binding peptides. *Biomacromolecules*, v.9, n.1, p. 966–973, 2008. DOI: 10.1021/bm701037x.

- GUNGORMUS, M.; OZDOGAN, M.; ERTEM, S.; TULUMBACI, F.; KARA, H.; ORHAN, M. Accelerated calcium phosphate mineralization by peptides with adjacent oppositely charged residues. *ACS Biomaterials Science Engineering*, 2020. DOI: 10.1021/acsbomaterials.0c001.
- GUNGORMUS, M.; TULUMBACI, F. Remineralização pré-adesão assistida por peptídeos da dentina para melhorar a adesão. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v.113, 2021. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2020.104119.
- HABELITZ, S.; MARSHALL, S.; MARSHALL, G.; BALOOCH, M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Arch Oral Biol.*, v.46, n.2, p. 173–183, 2001. DOI: 10.1016/s0003-9969(00)00089-3. PMID: 11163325.
- HE, B.; HAO, S. H. J. J. Y. Measurement of hydroxyapatite density and knoop hardness in sound human enamel and a correlational analysis between them. *Archives of Oral Biology*, v.55, n.2, p. 1344–141, 2010. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2009.12.
- HE, L.; HAO, Y.; ZHEN, L.; LIU, H.; SHAO, M.; XU, X.; LOVEREN, C. van. Biomineralization of dentin. *Journal of Structural Biology*, 2019. DOI: 10.1016/j.jsb.2019.05.010.
- HENCH, L. Bioceramics: From concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, v.74, n.7, p. 1487–1510, 2001.
- HENCH, L.; WILSON, J. Introduction to bioceramics. Word Scientific Publishing:, 1993.
- HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, R.; ROMERO-ÁNGELES, B.; URRIOLAGOITIA-CALDERÓN, G. U.-S. J. V.-F. R. M.-R. G. Mechanobiological analysis of molar teeth with carious lesions through the finite element method. *Appl Bionics Biomech.*, 2018. DOI: 10.1155/2018/1815830. PMID: 30405747; PMCID: PMC6204180.
- IVANCIK, J.; MAJD, H.; BAJAD, D.; ROMBERG, E.; AROLA, D. Contributions of aging to the fatigue crack growth resistance of human dentin. *Acta. Biomater.*, v.8,n.3, p. 2737–2746, 2012. 10.1016/j.actbio.2012.03.046. PMID: 22484693; PMCID: PMC3367091.
- JENG, Y.; LIN, T.; HSU, H.; CHANG, H.; SHIEH, D. Human enamel rod presents anisotropic nanotribological properties. *J Mech Behav Biomed Mater*, v.4, n.4, p. 515–522, 2011. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2010.12.002. PMID: 21396600.
- KATCHBURIAN, E. *Histologia e Embriologia Oral: Texto, Atlas, Correlações Clínicas*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. ISBN 978-85-277-3222-2.
- KIERSZENBAUM, A. L. *Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Science - Contents Direct, 2016.
- KIM, H.; HIMENO, T.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid. *Biomaterials*, v.26, n.21, p. 4366–4373, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.11.022. PMID: 15701365.
- KIM, Y.; DOUGLAS, E.; GOWER, L. Patterning inorganic (CaCO_3) thin films via a polymer-induced liquid-precursor process. *Langmuir*, v.23, p. 4862–4870, 2007.
- KINNEY, J.; BALOOCH, M.; MARSHALL, G.; MARSHALL, S. A micromechanics model of the elastic properties of human dentin. *Arch. Oral Biol.*, v.44, p. 813–822, 1999. DOI: 10.1002/term.1814.

KOKUBO, T. Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.120, n.1-3, p. 138–151, 1990.

KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.62, n.4, p. 600–612, 2002. DOI: 10.1002/jbm.10280.

KWAK, S.; LITMAN, A.; MARGOLIS, H.; YAMAKOSHI, Y.; SIMMER, J. Biomimetic enamel regeneration mediated by leucine-rich amelogenin peptide. *J Dent Res.*, v.96, n.5, p. 524–530. DOI: 10.1177/0022034516688659. PMID: 28113034; PMCID: PMC5453497.

LACRUZ, R.; HABELITZ, S.; WRIGHT, J.; PAINE, M. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol. Rev.*, n.97(3), p. 939–993, 2017. DOI: 10.1038/s41368-018-0038-6. PMID: 30610185; PMCID: PMC6320371.

LEGEROS, R. Calcium phosphates in oral biology and medicine: Monographs in oral science. Switzerland: Karger, 1991.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chemical reviews*, p. 4742–4753, 2008. PMID: 19006399 DOI: 10.1021/cr800427g.

LING, C.; ZHAO, W.; WANG, Z.; CHEN, J.; USTRIYANA, P.; GAO, M.; SAHA, I. Structure–activity relationships of hydroxyapatite-binding peptides. *Langmuir*, v.36, n.10, p. 2729–2739, 2020. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b03779.

MEALY, J.; O’KELLY, K. Cell response to hydroxyapatite surface topography modulated by sintering temperature. *J Biomed Mater Res A.*, v.103, n.11, p. 3533–3538, 2012. DOI: 10.1002/jbm.a.35487. PMID: 25903792.

MONSHI, A.; FOROUGHI, M.; MOUSHI, M. "modified scherrer equation to estimate more accurately nano-crystallite size using xrd". *World Journal of Nano Science and Engineering*, v.2, n.3, p. 154–160, 2012. DOI: 10.4236/wjnse.2012.23020.

MORADIAN-OLDAK, J. Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed)*, v.1, n.17, p. 1996–2023, 2012. DOI: 10.2741/4034. PMID: 22652761; PMCID: PMC3442115.

MORADIAN-OLDAK, J.; GEORGE, A. Biomineralization of enamel and dentin mediated by matrix proteins. *Journal of Dental Research*, v.100, n.10, p. 1020–1029, 2021. DOI: 10.1177/00220345211018405.

MOURA, F.; LOURO, L.; GOBBO, L.; SILVA, M. Parascholzite coatings on niobium substrates. *Key Engineering Materials*, v.493-49, p. 477–482, 2012.

MUSAT, V.; ANGHEL, E.; ZAHARIA, A.; ATKINSON, I.; MOCIOIU, O.; BUȘILĂ, M.; ALEXANDRU, P. A chitosan-agarose polysaccharide-based hydrogel for biomimetic remineralization of dental enamel. *Biomolecules*, v.11, n.8, 2021. DOI: 10.3390/biom11081137. PMID: 34439803; PMCID: PMC8392529.

NANCI, A. *Ten Cate’s Oral Histology: Development, Structure, and Function*. 7. ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2008.

- NASCIMENTO, M. Interação célula-proteína-implante no processo de osseointegração: Interação célula-proteína-implante. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v.4, n.2, p. 44–59, 2022. DOI: 10.36557/2674-8169.2022v4n2p44-59.
- NEVES, J.; ROCHA, D. N. da; LOPES, C. C.; SILVA, M. H. P. da; SINHORETI, M. A. C.; CORRER-SOBRINHO, L.; FRAGA, M. A. A.; CORRER, A. B. Effect of ph level and calcination on the production of calcium phosphates by acidic route of wet precipitation. *Cerâmica*, v.67, n.382, p. 236–243, 2021. DOI: 10.1590/0366-69132021673822965.
- NIU, L.; ZHANG, W.; PASHLEY, D.; BRESCHI, L.; MAO, J.; CHEN, J.; TAY, F. Fr. biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater.*, v.30, n.1, p. 77–96, 2014. DOI: 10.1016/j.dental.2013.07.013. PMID: 23927881; PMCID: PMC3867526.
- NUDELMAN, F.; LAUSCH, A.; SOMMERDIJK, N.; SONE, E. In vitro models of collagen biomineralization. *Journal of Structural Biology*, v.183, n.2, p. 258–269, 2013. DOI: 10.1016/j.jsb.2013.04.003.
- ORTIZ, I.; SANTOS, A. D.; COSTA, A.; MAVROPOULOS, E.; TANAKA, M.; SILVA, M.; CAMARGO, S. In vitro assessment of zinc apatite coatings on titanium surfaces. *Ceramics International*, p. 15502–15510, 2016.
- OTHMAN, Z.; PASTOR, B.; RIJT, S. V.; HABIBOVIC, P. Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics. *Biomaterials*, 2018. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.020.
- PAINE, M.; SEAD, M. Tooth developmental biology: disruptions to enamel-matrix assembly and its impact on biomineralization. *Orthod. Craniofac. Res.*, v.8, n.4, p. 239–251, 2005. DOI: 10.1111/j.1601-6343.2005.00346.x. PMID: 16238604.
- PANDYA, M.; DIEKWISCH, T. Enamel biomimetics-fiction or future of dentistry. *Int. J. Oral. Sci.*, v.5, n.11(1), 2019. DOI: 10.1038/s41368-018-0038-6. PMID: 30610185; PMCID: PMC6320371.
- PARK, S.; WANG, D.; ZHANG, D.; ROMBERG, E.; AROLA, D. Mechanical properties of human enamel as a function of age and location in the tooth. *J Mater Sci Mater Med*, v.19, n.6, p. 2317–2324, 2008. DOI: 10.1007/s10856-007-3340-y. Epub 2007 Dec 23. PMID: 18157510.
- PRASAD, M.; BUTLER, W.; QIN, C. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res.*, v.51, n.5, p. 404–417, 2010. DOI: 10.3109 / 03008200903329789. PMID: 20367116; PMCID: PMC2933432.
- RIBEIRO, S.; JUNIOR, V. D. V.; CAMPOS, J. D.; SANTOS, J. D.; LOPES, I.; ROCHA, D. D.; SILVA, M. D. Influences of biosilica content from amazonian freshwater sponge on calcium phosphates. *Journal of the Australian Ceramic Society*, v.57, p. 55–65, 2021.
- ROCHA, D. D.; CRUZ, L.; CAMPOS, J. D.; BLAZUTTI, R.; MIJARES, D.; COELHO, P.; SILVA, M. Mg substituted apatite coating from alkali conversion of acidic calcium phosphate. *Materials Science Engineering C-Materials for Biological Applications*, v.70, p. 408–417, 2017.
- ROGERO, S.; LUGÃO, A.; IKEDA, T.; CRUZ, A. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v.6, n.3, p. 317–320, 2003. ISSN: 1980-5373 DOI: 10.1590/S1516-14392003000300003.

- ROY, S.; BASU, B. Mechanical and tribological characterization of human tooth. *Materials Characterization*, v.59, n.6, p. 747–756, 2008. DOI: 10.1016/j.matchar.2007.06.008.
- SANTOS, A.; SOARES, G.; FILHO, F. The interaction between human osteoblastic cells and titanium anodized with sulphuric acid coated or not with human plasma fibronectin. *Key Engineering Materials*, v.396, n.98, p. 389–392, 2009.
- SENA, L. *Produção e Caracterização de Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno para Aplicações Biomédicas*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- SHAO, C.; JIN, B.; MU, Z.; LU, H.; ZHAO, Y.; WI, Z.; YAN, L.; ZHANG, Z.; ZHOU, Y.; PAN, H.; LIU, Z.; TANG, R. Repair of tooth enamel by a biomimetic mineralization frontier ensuring epitaxial growth. *Sci Adv.*, v.5, n.8, 2019. DOI: 10.1126/sciadv.aaw9569. PMID: 31497647; PMCID: PMC6716959.
- SHAO, L.; SUN, J.; ZHANG, C.; CHEN, C.; ZHENG, Y. C. B.; GU, X. Effect of aspartic acid on the crystallization kinetics of acp and dentin remineralization. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v.115, 2021. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2020.104226.
- SILVA, C.; SOMBRA, A. Estudo das propriedades estruturais e mecânicas do fosfato de cálcio dopado com óxido de silício obtido pelo método do estado sólido. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.5, n.3, p. 23–27, 2010. ISSN 1809-8797.
- SILVA, M. P. da; ROCHA, D. N. da. Composição de hidroxiapatita parcialmente substituída com nióbio e processo para sua obtenção. *Revista Militar de Ciência e Tecnologia*, 2011. BR n PI 020110137091.
- SILVA, T. F. da; PENNA, A. L. B. Colágeno: características químicas e propriedades funcionais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.71, n.3, p. 530–539, 2012.
- SINHORETI, M. A. C.; VITTI, R. P.; SOBRINHO, L. C. Biomateriais in dentistry: Current view and future perspectives. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, v.67, n.4, 2013. ISSN 0004-5276.
- SORUSHANOVA, A.; DELGADO, L.; WU, Z.; SHOLOGU, N.; KSHIRSAGAR, A.; RAGHUNATH, R.; D.I.ZEUGOLIS. The collagen suprafamily: From biosynthesis to advanced biomaterial development. *Advanced Materials*, v.31, n.1, 2018. DOI: 10.1002/adma.201801651.
- SUZUKI, S.; HARUYAMA, N.; NISHIMURA, F.; KULKARNI, A. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*, v.57, n.9, p. 1165–1175, 2012. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.03.005. PMID: 22534175; PMCID: PMC3517212.
- THULA, T.; SVEDLUND, F.; RODRIGUEZ, D.; PODSCHUN, J.; PENDI, L.; GOWER, L. Mimicking the nanostructure of bone: Comparison of polymeric process-directing agents. *Polymers (Basel)*, v.3, p. 10–35, 2011.
- VILLARREAL-RAMIREZ, E.; ELIEZER, D.; GARDUÑO-JUAREZ, R.; GERICKE, A.; PEREZ-AGUILAR, J.; BOSKEY, A. Phosphorylation regulates the secondary structure and function of dentin phosphoprotein peptides. *Bone*, v.95, p. 65–75. DOI: 10.1016/j.bone.2016.10.028. PMID: 2781025; PMCID: PMC5234040.

WOJCIECH; PAWLINA. *Ross Histologia - Texto e Atlas*. [S.l.]: Guanabara. Koogan: Grupo GEN, 2021.

XIAO, Z.; QUE, K.; WANG, H.; AN, R.; CHEN, Z.; QIU, Z.; LIN, M.; SONG, J.; YANG, J.; LU, D.; SHEN, M.; GUAN, B.; WANG, Y.; DENG, X.; YANG, X.; CAI, Q.; DENG, J.; MA, L.; ZHANG, X.; ZHANG, X. Rapid biomimetic remineralization of the demineralized enamel surface using nano-particles of amorphous calcium phosphate guided by chimaeric peptides. *Dent Mater.*, v.33, n.11, p. 1217–1228, 2017. DOI: 10.1016/j.dental.2017.07.015. PMID: 28774431.

YANG, X.; WANG, L.; QIN, Y.; SUN, Z.; HENNEMAN, Z.; MORADIAN-OLDAK, J.; NANCOLLAS, G. How amelogenin orchestrates the organization of hierarchical elongated microstructures of apatite. *J. Phys. Chem. B.*, v.114, n.(6), p. 2293–2300, 2010. DOI: 10.1021/jp910219s. PMID: 20104924; PMCID: PMC2848079.

ZADPOOR, A. Relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, v.35, p. 134–143, 2014. DOI: 10.1016/j.msec.2013.10.026. PMID: 24411361.

ZAVAGLIA, C.; SILVA, M. P. da. Feature article: Biomaterials. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-12803581-8.04109-6.

ZHANG, Y.; DU, W.; ZHOU, X.; YU, H. Review of research on the mechanical properties of the human tooth. *Int J Oral Sci.*, v.6, n.2, p. 61–69, 2014. DOI: 10.1038/ijos.2014.21. PMID: 24743065; PMCID: PMC5130056.

ZHAO, W.; XU, Z.; CUI, Q.; SAHAI, N. Predicting the structure–activity relationship of hydroxyapatite-binding peptides by enhanced-sampling molecular simulation. *Langmuir*, v.32, n.27, p. 7009–7022, 2016. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b01582.

ZHONG, B.; PENG, C.; WANG, G.; TIAN, L.; CAI, Q.; CUI, F. Contemporary research findings on dentine remineralization. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v.9, n.9, p. 1004–1016, 2013. DOI: 10.1002/term.1814.

ZHU, G.; YAO, S.; ZHAI, H.; LIU, Z.; LI, Y.; PAN, H.; TANG, R. Evolution from classical to non-classical aggregation-based crystal growth of calcite by organic additive control. *Langmuir*, v.32, n.35, p. 8999–9004, 2016.

ZISKIND, D.; HASDAY, M.; COHEN, S.; WAGNER, H. Young's modulus of peritubular and intertubular human dentin by nano-indentation tests. *J Struct Biol.*, v.174, n.1, p. 23–30, 2013. DOI: 10.1016/j.jsb.2010.09.010. PMID: 20850543.