

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA - MATERIAIS  
DENTÁRIOS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE UM COMPOSTO  
GRANULAR DE FOSFATO DE CÁLCIO DOPADO COM  
MAGNÉSIO PARA SUBSTITUIÇÃO ÓSSEA**

MARIELE DINA MILDNER

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup>. SUSANA MARIA WERNER SAMUEL

PORTO ALEGRE, 03 DE NOVEMBRO DE 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA - MATERIAIS  
DENTÁRIOS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE UM COMPOSTO  
GRANULAR DE FOSFATO DE CÁLCIO DOPADO COM  
MAGNÉSIO PARA SUBSTITUIÇÃO ÓSSEA**

MARIELE DINA MILDNER

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup>. SUSANA MARIA WERNER SAMUEL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito obrigatório para a obtenção do título de **Doutora em Odontologia** na área de concentração em Clínica Odontológica – Materiais Dentários.

PORTO ALEGRE, 03 DE NOVEMBRO DE 2021

Eu dedico esse trabalho aos meus pais, **Francisco** e **Laídes**. Obrigada por serem meu suporte, meus maiores incentivadores e estarem incondicionalmente ao meu lado. Obrigada por me estimularem a buscar meus objetivos, e instigar o estudo e a leitura desde sempre.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Francisco e Laídes e meus irmãos Endrigo e Eduardo pelo suporte, amor, e por serem exemplos de profissionais dedicados.

Aos meus amigos por todo o carinho, torcida e compreensão.

À minha orientadora, professora **Susana Maria Werner Samuel**, pela oportunidade, pelo conhecimento e pelo exemplo de dedicação e competência.

Aos professores **Fabício Mezzomo Collares** e **Vicente Castelo Branco Leitune**, por todo o ensinamento, paciência e pela presteza durante essa trajetória.

A todos do **Laboratório de Materiais Dentários (LAMAD)**, aos que já encerraram seu ciclo e aos que ainda estão presentes. Só tenho a agradecer pela amizade, pelo conhecimento compartilhado e pelas ajudas tão solícitas.

Ao **Laboratório de Materiais Cerâmicos (LACER)** e **Centro de Microscopia e Microanálise (CMM)** pela possibilidade de execução de análises.

À professora **Fernanda Visioli** e aos demais do **Laboratório de Patologia** pela ajuda na parte experimental, disponibilidade e prontidão.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, pela oportunidade de realização desse doutorado, e a todos os professores que participaram desse caminho.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** e à **Faculdade de Odontologia**, por ter a possibilidade do ensino de excelência, desde a Graduação até a Pós-Graduação.

## RESUMO

O objetivo da presente tese foi desenvolver e caracterizar um composto granular de fosfato de cálcio dopado com magnésio, com a finalidade de substituição óssea. O material foi sintetizado a partir de NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>. Foram testadas quatro diferentes proporções de Mg/Ca modificando esse fosfato de cálcio (2,75; 5,5; 8,5 e 11). O material resultante foi caracterizado por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), tamanho de partícula, área superficial específica, pH, difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia Raman. A viabilidade celular quando em contato com o material foi avaliada por meio do teste de colorimetria Sulforonamida B, usando ANOVA de uma via para análise estatística. Maiores proporções de Mg/Ca tendem a formar partículas menores e proporcionalmente com maior área superficial. Imagens de MEV mostram que a morfologia se torna mais arredondada à medida que aumenta a concentração de magnésio. FTIR revelou presença de grupos PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>-</sup> em todas as amostras. PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> também se fez presente na análise de Espectroscopia Raman. Análise de DRX mostrou presença de fosfato tricálcio e fosfato de cálcio na forma amorfa no grupo 2,75; fosfato tricálcio, fosfato de magnésio, fosfato de cálcio amorfo e fosfato de magnésio amorfo no grupo 5,5; fosfato tricálcio, fosfato de magnésio e fosfato de cálcio amorfo no grupo 8,5; e fosfato tricálcio, fosfato de magnésio e fosfato de cálcio amorfo no grupo 11. A viabilidade celular mostrou-se acima de 90% em todos os grupos, sem presença de diferença estatística entre eles ( $p = 0,222$ ). Resultados indicam que fosfato de cálcio dopado com magnésio nas proporções de 8.5 e 11 são promissoras para aplicação na odontologia.

Palavras-chave: Substitutos ósseos. Regeneração óssea. Fosfato de cálcio. Compostos de magnésio. Biomateriais

## ABSTRACT

The aim of the present thesis was to develop and characterize a new compound of magnesium doped calcium phosphate for bone graft. Synthesis was performed from NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub>. Four different Mg/Ca molar ratios were tested (2.75; 5.5; 8.5 and 11). The resultant material was evaluated and characterized regarding scanning electron microscopy (SEM), particle size and specific surface area, pH, X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (IR) and Raman spectroscopy. Cell viability was determined by SRB-colorimetric assays. One-way ANOVA was employed for statistical analysis. Higher Mg/Ca ratio tends to form particles with smaller size and proportional higher specific surface area. Morphology turn rounded with increase of magnesium concentration. IR Revealed presence of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> groups in all tested samples. PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> was also present in the analysis of Raman spectroscopy. XRD analysis show tricalcium phosphate and amorphous calcium phosphate in 2.75 group; tricalcium phosphate, magnesium phosphate, amorphous magnesium phosphate and amorphous calcium phosphate in 5.5 group; tricalcium phosphate, magnesium phosphate, and amorphous calcium phosphate in 8.5 group; and tricalcium phosphate, magnesium phosphate, and amorphous calcium phosphate in 11 group. Cell viability was higher than 90% for all tested groups, without statistical difference among them ( $p = 0.222$ ). Results show that magnesium doped calcium phosphates at 8.5 and 11 Mg/Ca molar ratio are promising for application in dentistry.

Key words: Bone grafts. Bone regeneration. Calcium phosphate. Magnesium compounds. Biomaterials.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>18</b>
<b>3 MANUSCRITO .....</b>	<b>19</b>
3.1 Introduction .....	20
3.2 Materials and Methods .....	22
3.3 Results and Discussion .....	25
3.4 Conclusions .....	32
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A regeneração de defeitos ósseos causados por trauma, infecções ou tumor é sempre um desafio clínico (GARCÍA-GARETA; COATHUP; BLUNN, 2015; TAZ et al., 2018). Quando se trata de reabilitação, os implantes dentários têm se tornado o procedimento padrão para reposição de dentes perdidos. É necessário, para isso, um volume ósseo e tecidual adequado para o sucesso estético e funcional no tratamento do paciente. Contudo, em alguns casos, o volume insuficiente de osso sadio pode comprometer o resultado final. Uma variedade de técnicas tem sido usada na tentativa de regenerar defeitos de osso alveolar no local do implante, como enxerto ósseo, distração osteogênica e regeneração óssea / tecidual guiada (MASOUDI RAD *et al.*, 2017). Na regeneração óssea guiada, o objetivo é manter e estabilizar o espaço para a proliferação de células osteogênicas, promover angiogênese e o fechamento primário da ferida (YAMADA; EGUSA, 2018).

O uso de enxerto autógeno é considerado padrão ouro devido às suas propriedades mecânicas, qualidade do osso formado e biocompatibilidade, mas possui desvantagens como disponibilidade, morbidade do sítio doador, dor e sangramento pós-operatório (BARONE et al., 2011; GARCÍA-GARETA; COATHUP; BLUNN, 2015; LI *et al.*, 2017; RH OWEN; DARD; LARJAVA, 2018; YAMADA; EGUSA, 2018). Desta forma, materiais que atuam como substitutos ósseos são vantajosos em relação ao enxerto autógeno, uma vez que desordens funcionais são evitadas (BARONE et al., 2011; TAO et al., 2018).

Desde os anos 1980, diversos materiais baseados em fosfatos de cálcio sintéticos têm sido pesquisados devido à sua biocompatibilidade e osteocondutividade (ATAOL et al., 2015; CHRISTEL et al., 2014; DOUARD et al.,



2016; LI et al., 2017; LIN; WU; CHANG, 2014; RODRÍGUEZ-LUGO et al., 2018; TRBAKOVIC et al., 2018a). Há diversos materiais no mercado que são usados com sucesso para este propósito (EBRAHIMI; BOTELHO; DOROZHKIN, 2017). Matriz óssea bovina é biocompatível e um bom mantenedor de espaço, mas não é reabsorvível por um período de pelo menos 11 anos (MORDENFELD *et al.*, 2010). Os materiais usados vão desde hidroxiapatita de origem natural até hidroxiapatitas totalmente sintéticas (HA) ou fosfato tricálcio (TCP) preparados através de sinterização, precipitação ou reação de conformação de cimento. Dependendo da composição química e tamanho, tipo e composição dos cristais, estes materiais podem ser estáveis (HA), ou degradarem lentamente *in vivo* (TCP) (CHRISTEL et al., 2014). Tanto osso bovino liofilizado quanto materiais baseados em fosfato de cálcio provêm resultados aceitáveis e similares quanto à indução da formação de osso ectópico (MIRON *et al.* 2016a, 2016b; WU; LI; LIN, 2016; ZHANG *et al.*, 2018).

Fosfato de cálcio (CaP) é o nome comum da família de minerais contendo cátions de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) com ânions de ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), metafosfato ( $\text{PO}_3^-$ ), ou pirofosfato ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ), e íons de hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) ou hidróxido ( $\text{OH}^-$ ). Fosfatos de cálcio com relação atômica Ca/P entre 1,5 e 1,67 são chamados de apatitas (hidroxiapatita ou fluorapatita) (ELIAZ; METOKI, 2017). Apesar de os fosfatos tricálcicos ( $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -TCP) possuírem a mesma composição química, eles diferem na sua estrutura cristalina e solubilidade, sendo o  $\beta$ -TCP mais estável que o  $\alpha$ -TCP (VOLKMER *et al.*, 2013).

**Tabela 1.** Fases de fosfato de cálcio para aplicações biomédicas

Relação molar Ca/P	Nome	Fórmula
0,5	MCPM (fosfato de cálcio monobásico monohidratado)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
1	DCPA (fosfato dicálcio anidro - Monetite)	$\text{CaHPO}_4$
1	DCPD (fosfato de cálcio dibásico desidratado - Brushite)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,33	OCP (fosfato octacálcio)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,5	$\alpha$ -TCP ( $\alpha$ -fosfato tricálcio)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,5	$\beta$ -TCP ( $\beta$ -fosfato tricálcio)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,2 - 2,2	ACP (fosfato de cálcio amorfo)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$
1,5-1,67	CDHA (hidroxiapatita cálcio deficiente)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x} \cdot (\text{OH})_{2-x}$
1,67	Hap ou OHAp (hidroxiapatita)	$\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)_6(\text{OH})_2$
2	TTCP ou TetCP (fosfato tetracálcio)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$

Extraído de ELIAZ; METOKI, 2017.

A hidroxiapatita é o maior constituinte inorgânico do osso (60% em peso) e o principal constituinte do esmalte dentário (90%). A maioria das pesquisas tem focado nos fosfatos de cálcio (CaP), em particular hidroxiapatita [HA  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ],  $\beta$ -fosfato tricálcio [ $\beta$ -TCP  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ], e suas composições, que são chamadas fosfatos de cálcio bifásicos (BCP), já que no corpo humano, 65% desses compostos consiste de apatita carbonatada (BOHNER et al., 2013; EBRAHIMI; BOTELHO; DOROZHKIN, 2017; RH. OWEN; DARD; LARJAVA, 2018). O núcleo do mecanismo da bioatividade do CaP é a dissolução parcial e liberação de produtos iônicos *in vivo*. Contudo, a dissolução do CaP é relacionada principalmente com sua composição química. De maneira geral, fases como HA, TCP e OCP não dissolvem facilmente *in vivo*, sendo que  $\beta$ -TCP é mais solúvel que HA. OCP e TCP dissolvem mais rapidamente que HA em fluidos corporais (ELIAZ; METOKI, 2017). O comportamento de dissolução dos

materiais bifásicos é relevante não apenas ao se considerar a reabsorção do material *in vivo*, mas também pelo padrão de trocas iônicas (GALLINETTI; CANAL; GINEBRA, 2014).

Um problema que limita a ampla aplicação clínica dos fosfatos de cálcio são suas propriedades mecânicas. O CaP pode ser frágil e possuir baixa resistência ao impacto e tensão (6-10 MPa) (AMBARD; MUENINGHOFF, 2006). A principal razão para isso é sua porosidade, que serve como sítio de início preferencial para propagação de fraturas. Entretanto, sua resistência compressiva é maior que a do osso normal (AMBARD; MUENINGHOFF, 2006).

As propriedades necessárias em um CaP para uso médico são bioatividade, biocompatibilidade, bioestabilidade, estabilidade interfacial e boa adesão, osseointergração, osteocondução, osteoindução, reabsorção, capacidades terapêuticas e molhabilidade (ELIAZ; METOKI, 2017). Biocompatibilidade é definida como a compatibilidade de um material com o organismo em nível sistêmico e celular. Materiais bioativos são aqueles que formam uma ligação orgânica com o tecido hospedeiro. Osteocondutividade define a habilidade de um material de prover uma estrutura onde as células podem aderir-se e proliferar. Osteoindução é o potencial de um material desencadear diferenciação osteogênica (ATAOL *et al.*, 2015). Osteocondutividade e osteoindução são considerados indicadores de bioatividade (ATAOL *et al.*, 2015). O fosfato de cálcio é bioativo, biocompatível e osteocondutivo (BOHNER *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017), o que faz dele um bom material para neoformação óssea. No sítio de implantação, o arcabouço de fosfato de cálcio provê espaço para crescimento celular (QIN *et al.*, 2017); e permite uma substituição progressiva do tecido natural, com degradação gradual

do material implantado (GHOSH; SARKAR, 2016). O CaP dissolve parcialmente *in vivo*, seja por atividade celular, extracelular ou ambas (ELIAZ; METOKI, 2017; TRBAKOVIC *et al.*, 2018a). Apesar da capacidade de sustentar o crescimento de osso viável no local do enxerto (osteocondutividade), ele normalmente não induz crescimento ósseo *per se* (osteoindução) (PETTA *et al.*, 2016).

No intuito de melhorar a resposta biológica e osseointegração das biocerâmicas, diversas composições e microestruturas têm sido testadas (CHAMPION, 2013). A adesão celular, no caso do CaP, é fortemente influenciada pela rugosidade de superfície, solubilidade, tamanho do grão, tamanho de partícula e energia de superfície (LIN; WU; CHANG, 2014; SAMAVEDI; WHITTINGTON; GOLDSTEIN, 2013). A porosidade do CaP não é importante somente para as propriedades mecânicas e reabsorção. O CaP permite o crescimento de tecido ósseo e células. Tradicionalmente ele possui macroporos, com diâmetro entre 330 - 100  $\mu\text{m}$  (LUCAS-APARICIO *et al.*, 2020). Além disso, a presença de microporos (<10  $\mu\text{m}$ ) também é requerida para liberação e absorção de substâncias e transporte de nutrientes (LUCAS-APARICIO *et al.*, 2020). Estudos tem demonstrado que aumentar a área de superfície específica e volume dos poros de um biomaterial para reparo tecidual pode acelerar a cinética do processo biológico de deposição da apatita e aumento da formação óssea (LIN; WU; CHANG, 2014; RH. OWEN; DARD; LARJAVA, 2018). Topografia e textura demonstram ter influência na performance biológica dos fosfatos de cálcio. Isso pode ser atribuído à sensibilidade das células aderentes à topografia do substrato (SADOWSKA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019). Nanopartículas de CaP com forma e tamanho controlados são fundamentais para aumentar a biocompatibilidade, bioatividade

e osteocondutividade (DALTIM *et al.*, 2019). Em materiais bioativos, também pode haver uma influência indireta, como por exemplo, a interação com fluidos corporais (SADOWSKA *et al.*, 2018). A troca iônica com o meio pode ser modificada caso a forma – e por consequência a área superficial – forem alteradas (SADOWSKA *et al.*, 2018). É possível encontrar traços de substâncias diversas na hidroxiapatita, substituindo o fosfato de cálcio, como  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  entre outros. Uma liberação local destes elementos em baixa dosagem pode melhorar a regeneração óssea, uma vez que podem alterar a composição e solubilidade da hidroxiapatita, mas também são importantes na proliferação celular, síntese de colágeno, desenvolvimento ósseo e possuem propriedades farmacológicas. Como exemplo, a redução da incidência à fratura em pacientes osteoporóticos (XIA *et al.*, 2011).

Substitutos ósseos baseados em CaP são encontrados em diferentes formas como grânulos, blocos porosos, cimentos, massas, pastas, esponjas ou membranas (BOHNER *et al.*, 2013). O grânulo é a forma mais frequente de uso devido ao seu baixo custo, ampla disponibilidade e boas propriedades biológicas (BOHNER *et al.*, 2013). Apesar de existirem diferentes métodos de síntese de fosfatos de cálcio – (lixiviação de sal, liofilização, espuma) - ainda não há um controle preciso para parâmetros como tamanho, forma e porosidade (JUIGNET *et al.*, 2017). Os diferentes métodos de produção são classificados de acordo com vários critérios: tipos de reagentes usados para produzir partículas esféricas, os meios em que as partículas/agregados serão dispersas ou formadas, as ferramentas de dispersão, as reações de consolidação que as transformam em partículas esféricas sólidas, o diâmetro das partículas resultantes, e as fases de CaP que podem ser obtidas (BOHNER *et al.*, 2013).

De uma maneira ampla, podem ser categorizados em processos que envolvem altas temperaturas (pirólise) e outros realizados em baixas temperaturas (FEDOROVNA KOROLEVA; DOBRINSKAYA; KAMANTSEV, 2017). Os processos de baixa temperatura podem ainda ser subdivididos em métodos úmidos – precipitação química, sol-gel, hidrólise – e métodos secos – síntese sólida e síntese mecânico-química (ATAOL *et al.*, 2015). Na síntese por via úmida, obtêm-se produtos com elevada pureza e alta taxa de rendimento. No entanto, nas reações para obtenção de HA através do uso de nitratos e cloretos de cálcio, há a necessidade de processos posteriores de lavagem para remoção destes nitratos e cloretos presentes. As temperaturas de síntese normalmente são inferiores a 100°C, permitindo formação de nanopartículas. Entretanto, etapas posteriores de calcinação se fazem necessárias para aquisição de produtos com maior cristalinidade (OKADA; MATSUMOTO, 2015). Tradicionalmente, os CaPs são obtidos por rotas de alta temperatura de síntese. Nos últimos anos, tem sido estudado o potencial de uso de condições de reação com rotas biomiméticas (SADOWSKA *et al.*, 2017). A escolha por determinado método de síntese poderá ser influenciada pela simplicidade das operações, pureza do produto resultante, homogeneidade e tamanho das partículas, custo dos precursores e custo final do processo.

A forma em que o fosfato de cálcio será dispensado no sítio cirúrgico pode impactar em sua porosidade e propriedades mecânicas. Deve haver coesão suficiente para prevenir a desintegração no corpo (O'NEILL *et al.*, 2017). Otimizar a fase sólida de um cimento de fosfato de cálcio torna-se um fator importante a fim de aumentar a sua facilidade de injeção. Para isso, a redução do tamanho de partícula pode aumentar a sua viscosidade, devido à diminuição da fração

máxima de volume sólido (O'NEILL *et al.*, 2017). Partículas esféricas de CaP demonstram também maior facilidade de injeção quando comparadas às partículas irregulares (MATAMOROS-VELOZA *et al.*, 2020; O'NEILL *et al.*, 2017). Modificações na hidroxiapatita podem proporcionar uma maior flexibilidade nas suas propriedades. Fazer substituição de íons por cátions ( $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ag^{+}$ ) e/ou ânions ( $CO_3^{2-}$ ,  $SiO_4^{3-}$ ,  $F^{-}$ ) é uma das maneiras de alterar sua biocompatibilidade, possibilidade de sinterização e propriedades mecânicas (OKADA; MATSUMOTO, 2015). Alterar a proporção pó / líquido em um cimento de fosfato de magnésio também pode otimizar suas propriedades mecânicas e facilidade de injeção (MOSEKE; SARATSI; GBURECK, 2011).

A maioria dos substitutos ósseos com CaP tem diâmetro que permite o crescimento de vasos sanguíneos no espaço interpartículas, favorecendo assim a rápida reabsorção da cerâmica e crescimento ósseo (KHURANA *et al.*, 2019). RUMPLER *et al.*, em 2008, relatou que as células podem reagir à macroarquitetura, e o crescimento local de tecido é proporcional à curvatura do substrato. Os osteoclastos aderem à superfície do material criando uma área de reabsorção justa abaixo delas. Liberação de prótons pelos osteoclastos diminuem localmente o pH, levando à dissolução físico-química do CaP. Assim, a composição do material, solubilidade, tamanho do grão, cristalinidade, topografia e rugosidade podem afetar tanto a adesão e atividade do osteoclasto, e a atividade de reabsorção (GALLO *et al.*, 2019). A interação entre forma e tamanho das partículas de CaP e sua performance requer um melhor controle de seu formato (DALVIN *et al.*, 2019). A produção controlada de partículas esféricas de fosfato de cálcio permanece um desafio (BOHNER *et al.*, 2013).

Devido ao fato de os antibióticos apresentarem uma meia-vida curta e a área óssea infectada apresentar pobre circulação sanguínea, pode se fazer necessário o uso de altas doses de medicamentos sistêmicos, que podem alcançar níveis tóxicos (LUCAS-APARICIO *et al.*, 2020). Fosfatos de cálcio têm se mostrado eficazes como sistemas distribuidores de medicamentos para proteínas, ácidos nucleicos, antibióticos e drogas anticâncer devido a sua alta relação entre área superficial e volume, bioatividade de superfície superior e grande capacidade de absorver biomacromoléculas (KALANTARI *et al.*, 2019; OKADA; MATSUMOTO, 2015; PETTA *et al.*, 2016). Podem inclusive ir além da aplicação como substituto ósseo, e as esferas serem usadas como carreadoras em gel clareador dentário (MELLGREN *et al.*, 2018), ou como tratamento de superfície em implantes dentários (ITO *et al.*, 2018). A superfície dos materiais baseados em CaP é marcada pela presença de íons cálcio e fosfato, sendo essa característica explorada em sistemas de distribuição de medicamentos (PETTA *et al.*, 2016). A hidroxiapatita permite um controle de textura, tamanho de poros, área superficial e funcionalização da superfície, que tem papel primordial no desenho destes sistemas de distribuição (TURON *et al.*, 2017). Um grande número de estudos tem se voltado para a síntese de partículas esféricas para distribuição de medicamentos. Como resultado, a estrutura interna das partículas, como porosidade, distribuição do tamanho dos poros, ou distribuição do tamanho da interconexão entre os poros é de particular relevância (BOHNER *et al.*, 2013). Para uso como substituto ósseo em odontologia, o foco é no espaço entre as partículas. Os vasos sanguíneos e células devem estar aptos a invadir a rede interpartículas para promover reabsorção da cerâmica e formação óssea através do defeito preenchido. Assim, as partículas devem ser grandes o



suficiente para promover um crescimento fácil de vasos sanguíneos e osso, mas não tão grandes para manter um tempo de reabsorção aceitável (BOHNER *et al.*, 2013). Partículas de tamanho relativamente médio ou grande de fosfato de cálcio (250-500 ou 1000-2000  $\mu\text{m}$ ) tendem a manter o volume inicial melhor que partículas pequenas (90-120  $\mu\text{m}$ ) (YAMADA; EGUSA, 2018). Isso porque células osteoclásticas parecem preferir partículas menores (< 1 mm) tanto em osso autógeno quanto em substitutos como osso mineral bovino (YAMADA; EGUSA, 2018). Contudo, à medida que as partículas ficam menores em tamanho, a mobilidade no corpo fica maior. Uma razão grande entre superfície e volume das nanopartículas provê alto potencial de crescimento dos cristais e mineralização biológica (ATAOL *et al.*, 2015). MOSEKE *et al.*, (2012) relata que partículas irregulares podem ocasionar irritação e inflamação nos tecidos adjacentes.

A hidroxiapatita cresce espontaneamente como flocos, fibras ou varetas, se não houver espécies orgânicas introduzidas durante o crescimento do cristal (XIA *et al.*, 2011). Para a síntese de micro ou nano HA com estrutura esférica, moléculas orgânicas e polímeros desempenham papel importante na sua formação (XIA *et al.*, 2011). Produzir formas complexas de HA sem adição de espécies orgânicas permanece um desafio. O magnésio pode influenciar a estrutura e morfologia do fosfato de cálcio pela inibição do processo de cristalização na precipitação do fosfato de cálcio. Este efeito inibitório é a chave para formação de esferas de fosfato de cálcio (QIN *et al.*, 2017).

A incorporação do magnésio ao CaP permite uma degradação controlada para que ocorra uma melhora das taxas de regeneração óssea (BALLOUZE *et al.*, 2021). Dopagem de fases de fosfato de cálcio por íons como magnésio pode guiar resposta celular e toda a cinética de reabsorção do material (GALLO *et al.*,

2019). Amostras dopadas podem mostrar regeneração óssea significativamente maior ao receberem cargas cíclicas quando comparadas com amostras puras (SAMANTA *et al.*, 2019). Ele não é apenas um dopante para o CaP, mas também afeta a reação e solubilidade dos produtos (QIN *et al.*, 2017).

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo do presente estudo é sintetizar um composto granular de fosfato de cálcio dopado com diferentes proporções de magnésio, e a posterior caracterização do material resultante, bem como avaliar sua biocompatibilidade.

### **3 MANUSCRITO**

A presente tese é composta por um manuscrito que será submetido à Materials Science and Engineering C.

O manuscrito, formatado de acordo com os requisitos do periódico ao qual será submetido, encontra-se a seguir.

# SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MAGNESIUM DOPED CALCIUM PHOSPHATE GRANULES FOR BONE GRAFT SUBSTITUTES

## 1. Introduction

Adequate bone and tissue volumes are required for successful esthetic and functional rehabilitation with dental implants. The regeneration of bone defects caused by trauma, infection or tumors is a clinical challenge (1). For clinical use, autogenous bone is considered the gold standard due to its mechanical properties, significance in new bone formation and biocompatibility. However, it has many disadvantages such as availability, increased surgical procedure and higher morbidity of the donor site (1–6).

The human bone consists of 65% carbonated apatite; thus, most research has been focusing on calcium phosphates (CaP), particularly hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate and their composite called biphasic calcium phosphates (BCP) (4,7,8). Over the past 30 years, several synthetic calcium phosphate-based materials have been the focus of research regarding biocompatibility and additional properties, including osteoconductivity (3,9–12). The material applied for this purpose extends over the use of natural (e.g., bovine mineral bone) and synthetic hydroxyapatites (HAp) or tricalcium phosphates (TCP) (9). Bovine mineral bone is biocompatible and a good space maintainer; however, it is not resorbable for at least 11 years (13). In addition, the most common bioceramics for this application are calcium phosphate-based (CaP) biomaterials that include hydroxyapatite (HAp),  $\alpha$ - and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP), octacalcium phosphate (OCP), amorphous calcium phosphate (ACP) and biphasic calcium phosphates (BCP) (14).

A multiplicity of properties may be required in medical applications, such as bioactivity, biocompatibility, biostability, interfacial stability, good adhesion, osseointegration, osteoconduction, osteoinduction, resorption, therapeutic capabilities, and wettability (14). At the site of implantation, biocompatible and bioresorbable calcium phosphate provides space for cell growth (15); and permits the progressive replacement of the natural host tissue with the gradual degradation of the inserted material (16). For tissue engineering, some

characteristics such as grain size, morphology and additional functionalities are desirable and can be improved.

The preparation of calcium hydroxyapatite can be divided into high-temperature (pyrolysis) and low-temperature (precipitation and hydrolysis) processes (17). Calcium phosphates can be prepared by sintering, precipitation, or a cement-setting reaction (9). In addition, selecting a synthesis method may be influenced by the simplicity of operations, purity of the resulting product, homogeneity, particle size, precursors and final production costs. Granules are the most used materials because their relatively low cost, broad availability, and good biological properties (7).

Attempts to increase the biological response and osseointegration of these bioceramics, chemical compounds, architectures, and microstructures have been tested (18,19). The bioactivity of calcium phosphates can be improved by partial substitution of carbonate groups for phosphate groups, forming calcium-deficient hydroxyapatites, that contain cation vacancies, which ensure the incorporation of doping microelements into the crystal structure of the material. Furthermore, cell adhesion is strongly influenced by surface roughness, solubility, grain size, particle size and surface energy (10,20). Topography and textural properties have also been shown to affect the biological performance of calcium phosphates, which may be attributed to the sensitivity of the adherent cells to the substrate topography (21).

Calcium phosphates have been successfully used as drug delivery systems for proteins, nucleic acids, antibiotics, and anticancer drugs because of their high surface area to volume ratio, superior surface bioactivity, and biomacromolecule absorption (22). Many studies have focused on the synthesis of spherical particles for drug delivery. A wide range of properties can be obtained, such as particle diameter, particle size distribution, porosity, and composition (7). Organic molecules and polymers also play a significant role in the synthesis of spherical HA (23). However, producing the complex forms of HA crystals without the addition of organic species remains a challenge (23).

The results of previous studies suggest that magnesium is an effective dopant for the synthesis of various types of calcium phosphate phases (15). Thus, this study aimed to synthesize and characterize four formulations of magnesium-doped calcium phosphate as bone substitutes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Powder synthesis

The powders were prepared by conventional aqueous precipitation, modified based on a previous method (15). Sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), sodium phosphate dibasic (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), potassium phosphate monobasic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) and calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) (all purchased from Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were diluted in distilled water under magnetic stirring for 1 h. The solution was maintained at 100°C for 24 h. Then, the resulting precipitate was separated using a filter paper, washed with distilled water and dried at 60°C for 3 days. The amount of each component and the Mg/Ca ratio are described in Table 1. The Ca/P ratio was 0.9, for all tested groups. The samples were divided into four groups, according to the corresponding Mg/Ca molar ratio used for each synthesis (2.75, 5.5, 8.5, and 11).

**Table 1:** Mg/Ca molar ratio and ions amount (g) of each component considered in the doped phosphates

Mg/Ca molar ratio	MgCl <sub>2</sub>	NaCl	KCl	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>
2.75	5.13 g					
5.5	10.43 g	0.039 g	0.011 g	12.605 g	12.08 g	1.384 g
8.5	16.65 g					
11	21.55 g					

### 2.2. Characterisation

#### 2.2.1. Scanning electron microscopy (SEM)

The morphology of the particles was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) (Inspect F50, FEI, Tokyo, Japan) at 20 kV and a magnification of 10,000x, and energy dispersive spectroscopy was performed using x-act Penta FET<sup>®</sup> Precision (Oxford Instruments, Oxfordshire, UK). Before SEM analysis, the specimens were coated with gold to increase their conductivity.

### 2.2.2. Size distribution and specific surface area (SSA)

The size and surface area of the particles were analyzed using laser diffraction and nitrogen adsorption, respectively. A particle size analyzer (CILAS 1180, France) was used and the particles were dispersed in isopropyl alcohol (Aldrich Chemical; St Louis, MO, USA) for measurements. Nitrogen adsorption measurements were performed using an Autosorb Quantachrome Nova 1200 (Quantachrome Instruments Corporate Headquarters, USA) instrument. The powder-specific surface area was calculated by the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method based on nitrogen adsorption isotherm data.

### 2.2.3. X-ray diffraction (XRD)

X-ray diffraction patterns of the powders were recorded on a diffractometer (X'Pert MDP, Phillips, Enschede, Netherlands) using Cu K $\alpha$  radiation. Data were collected in a  $2\theta$  range from 10 to 70° with continuous scanning. The crystalline phases were determined from a comparison of the registered patterns with the ICDD powder diffraction file (PDF).

### 2.2.4. Infrared spectroscopy (IR)

Infrared spectra were recorded on a Fourier-transform spectrometer (Vertex 70, BrukerOptics, Ettlingen, Germany). The synthesized powder was placed in the ATR device and measurement was performed in the range of 4000–400 cm<sup>-1</sup> and 64 scans with a 4 cm<sup>-1</sup> resolution

### 2.2.5. Raman spectroscopy

Powders were analysed with Raman Spectroscopy (SENTERRA model, Bruker Optics, Germany) operated with a diode laser of 785 nm wavelengths, 100 mW of intensity, for 5 s and two co-additions. The range of analysis was 400–1800 cm<sup>-1</sup>.

### 2.2.6. pH

Specimens (0.3g) were immersed in 200 mL distilled water, and the pH of the solution was measured with a digital pHmeter (D-22 Digimed- São Paulo, São Paulo Brazil). The pH of the solution was recorded after 1, 5, 15, and 30 min, 1



and 2 h, and 1, 3, 7, 14 and 21 days. Water content did not change during the experiments.

### *2.3. Cell culture*

The culture was prepared using commercial pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil), cultivated in alpha minimum essential medium ( $\alpha$ -Men- Thermo Fisher Scientific, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS — Thermo Fisher Scientific, USA) and 1% penicillin (Thermo Fisher Scientific, USA) and stored in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

The conditioned medium was produced by immersing the materials in the culture medium for 24 h. Powders were placed in the bottom of well plates in an area to volume ratio of 3 cm<sup>2</sup>/mL. The samples were sterilized for 1 h under UV light before the preparation for these tests.

#### *2.3.1 Cell viability*

2.3.1.2. The sulphorhodamine B (SRB) assay was used to test the viability of MC3T3-E1 cells (n = 3 for each sample). Cells were seeded in 96-well plates (5 × 10<sup>3</sup> cells/well). After 24 h, conditioned media were used to treat the cells for 72 h. Cells were then fixed and stained with 0.4% SRB solution and were suspended in 10% Tris for quantification at 560 nm using a microplate spectrophotometer (MultiskanGO, Thermo Fisher Scientific, USA). Cells cultivated without the material medium were used to normalize the results and to calculate the percentage of viable cells. The tested groups and the control medium were analyzed in triplicate.

### *2.4 Statistical analysis*

A descriptive analysis was performed for particle characterization. For cell viability, one-way ANOVA and Tukey's test were performed, at 5% level of significance.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Characterization of synthesized powders

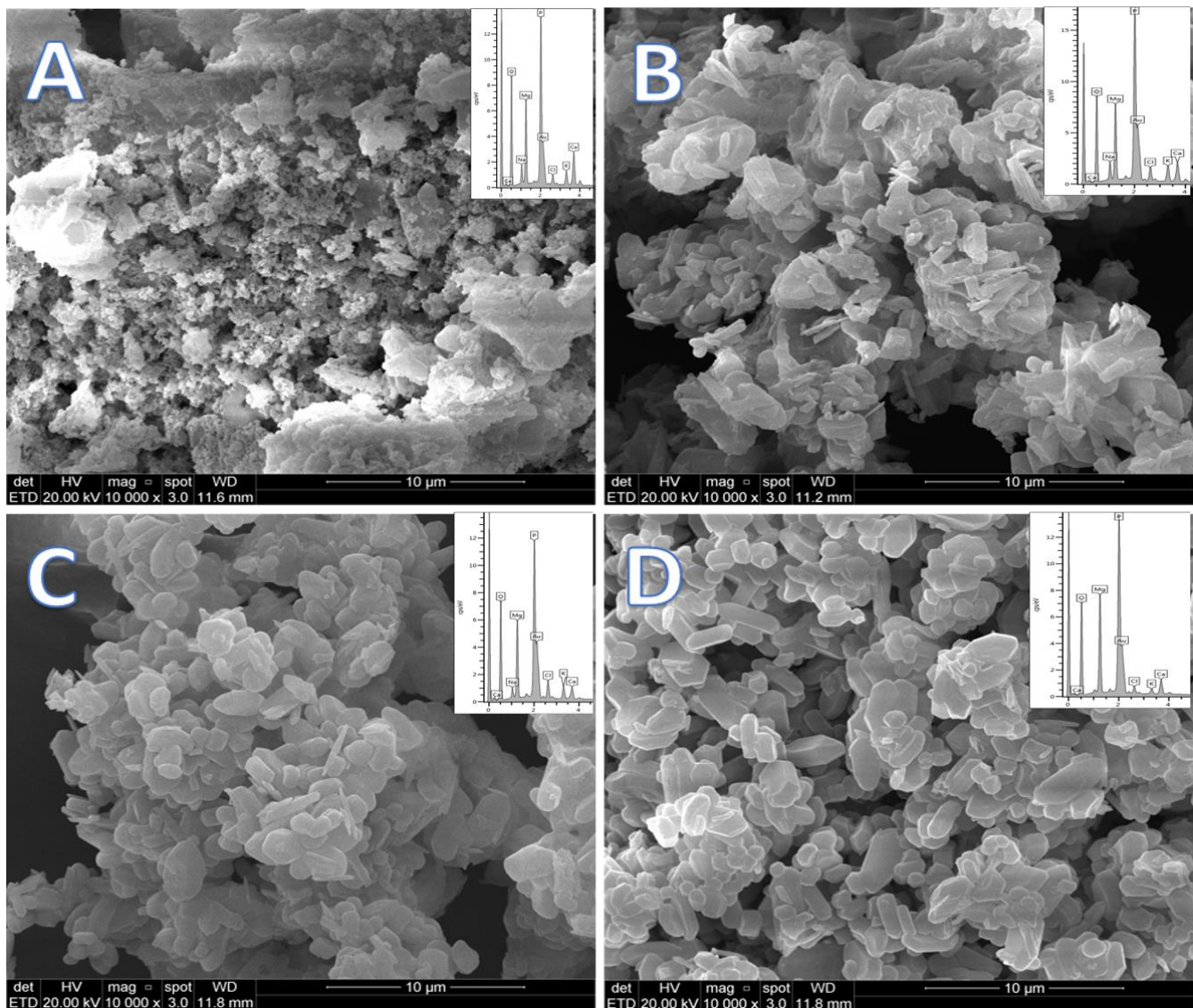
The mean particle size ( $\mu\text{m}$ ) and specific surface area ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) of the magnesium-doped calcium phosphate particles are listed in Table 2. The particle distribution was relatively uniform, and a higher Mg/Ca ratio tended to form particles with smaller sizes and specific surface areas. Furthermore, SEM images (Fig. 1) show that the morphology of calcium phosphate became rounded with the increasing magnesium concentration. Similar results have been reported by Qin *et al.* (15).

**Table 2:** Particle size ( $\mu\text{m}$ ) and specific surface area ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) of magnesium-doped calcium phosphate groups.

	2.75	5.5	8.5	11
<b>Mean particle size</b>	11.14 $\mu\text{m}$	5.17 $\mu\text{m}$	1.69 $\mu\text{m}$	1.77 $\mu\text{m}$
<b>Specific surface area</b>	7.08 $\text{m}^2/\text{g}$	3.22 $\text{m}^2/\text{g}$	3.73 $\text{m}^2/\text{g}$	4.35 $\text{m}^2/\text{g}$

Among bone grafts, synthetic bone graft substitutes are of particular interest because of their unlimited supply and reproducible properties (24). There are several methods for the preparation of calcium phosphate nanoparticles. However, very few of them are satisfactory in terms of economics, mainly because of the diverse materials needed in the synthesis and the complex and expensive processes (25). In this study, we prepared and characterized calcium phosphate granules with four different Mg/Ca molar ratios to assess their suitability for forming spherical particles to be used as bone substitutes. The mobility of particles in the body increases with a decrease in size. The large surface-to-volume ratio of the nanosized particles also provides a high crystal growth potential and thereby biological mineralization (11). In our study, the particle size decreased with higher Mg content, and the spherical surface area (SSA) was proportionally larger. A the large surface area intensifies the surface ionic interaction of calcium phosphate particles with the biological environment,  $\text{Ca}^{+2}$  ions react with free ions, and crystal apatite nucleation is favored, resulting in higher biomineralization (11). Particle size also influences osteoinduction *in*

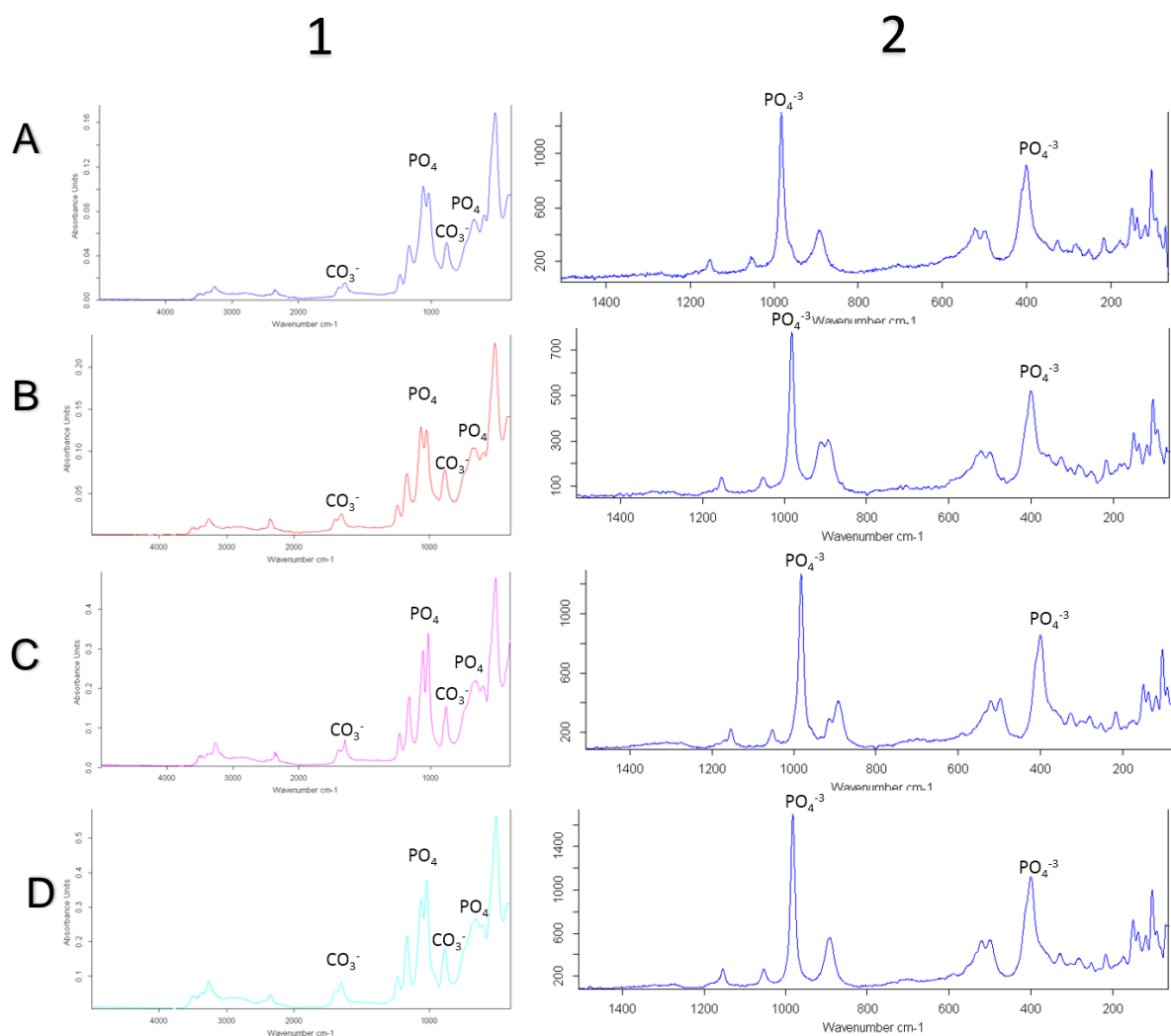
*vivo* (1). Previous studies (24,26,27) have associated low sintering temperatures with small grain sizes and higher SSAs. Another benefit related to their morphology is their improved injectability. For 3D printing, for example, a smooth and homogeneous powder is required. To accomplish this, granular raw materials must exhibit good flowability, which can be increased using spherical granules (28). Desirable injectability characteristics can also be obtained with Mg-substituted-TCP cement pastes, which was demonstrated by Pina *et al.* (29) to be dependent on cement composition.



**Fig. 1.** Scanning microscopy and EDS of particles with Mg/Ca molar ratio of **A:** 2.75, **B:** 5.5, **C:** 8.5, **D:** 11

### 3.2. Infrared spectroscopy (IR) and Raman spectroscopy

The IR and Raman spectra of all the synthesized powders are shown in Fig. 2. The IR spectra of all samples showed  $\text{PO}_4^{3-}$  functional groups at 600-610  $\text{cm}^{-1}$  and 1040-1050  $\text{cm}^{-1}$ . Bands at 870-880  $\text{cm}^{-1}$  can be attributed to carbonate groups ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), which substituted the  $\text{PO}_4^{3-}$  groups in calcium-deficient HA. Raman spectra also indicated  $\text{PO}_4^{3-}$  functional groups at 990  $\text{cm}^{-1}$  at a higher intensity and at 400  $\text{cm}^{-1}$ . The single peak at 962  $\text{cm}^{-1}$  in the 2.75 and 11 tested groups matched with the HA Raman spectra, and the double peak in the 5.5 and 8.5 groups matched with the  $\beta$ -TCP Raman spectra. Ebrahimi *et al* (26) observed that the influence of calcination temperature on structural groups was also detected at a lower temperature ( $\leq 500^\circ\text{C}$ ) and culminated in a broader phosphate band (at 1000  $\text{cm}^{-1}$ ) in nHA. These findings are consistent with those of our study.

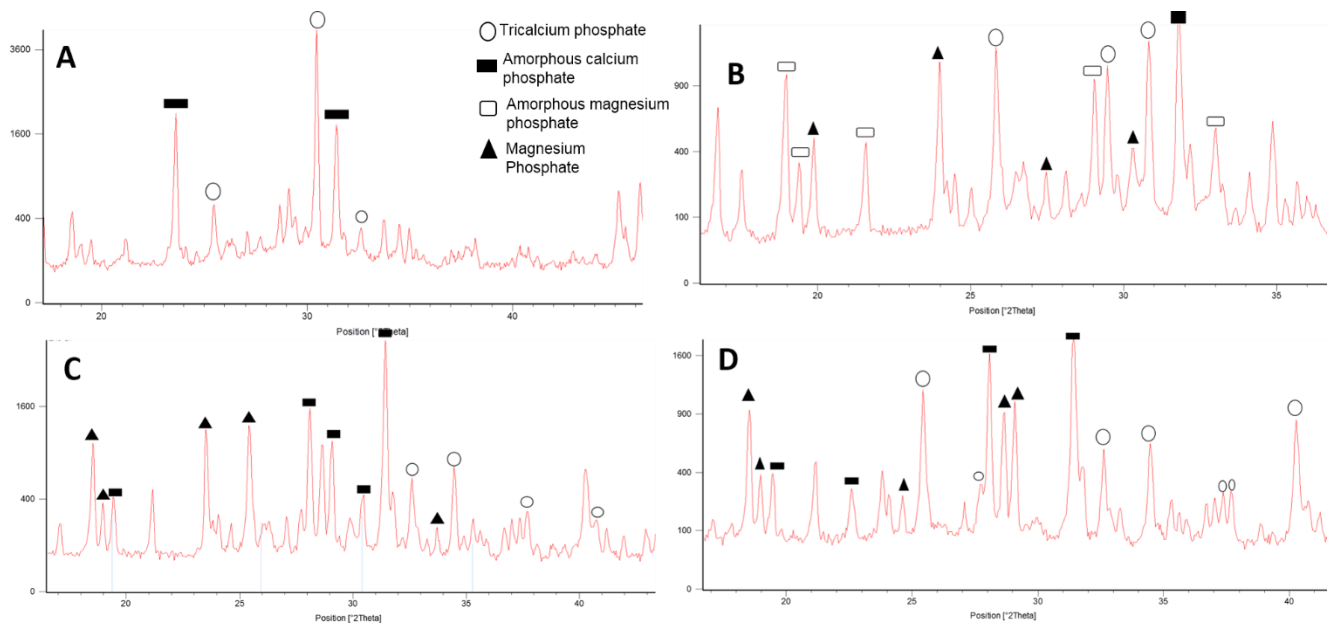


**Fig. 2.** IR (col 1) and Raman spectra (col 2) at the molar ratio of 2.75 (A), 5.5 (B), 8.5 (C) and 11 (D) Mg/Ca

### 3.3. X-ray diffraction (XRD)

The sample compositions were inferred from the chemical analysis by X-ray diffraction (XRD) (Fig. 3). The major peaks were confirmed using the International Centre for Diffraction Data (ICDD) powder diffraction database files. For the 2.75 group, XRD patterns showed crystalline tricalcium phosphate and amorphous calcium phosphate. In 5.5 sample, magnesium phosphate was present, in amorphous and crystalline form, besides tricalcium phosphate. Meanwhile, 8.5 and 11 tested groups indicated the presence of tricalcium phosphate and magnesium phosphate. The analysis thus revealed the heterogeneity of the powder structure.

Previous studies have shown that HA synthesized at a low calcination temperature exhibits broader XRD diffraction peaks with lower intensities. An increase in calcination temperature results in narrowing and sharpening of the diffraction peaks, which indicate of elevated crystallinity and an increase in particle size (26). The  $\beta$ -polymorph of TCP, stable at room temperature, is preferred to the  $\alpha$ -TCP, because of its biocompatibility, its higher mechanical strength and its lower dissolution rate (30).



**Fig. 3.** Diffractograms of synthesized powders at the molar ratio of 2.75 (A), 5.5 (B), 8.5 (C) and 11 (D) Mg/Ca

### 3.4. pH

The pH measurements showed small variations over 21 periods (Fig. 4). The behavior of all tested formulations was similar, except for the 2.75 group at 30 min that presented the highest result. Nonetheless, the results were similar for all tested groups. Osteoclasts degrade the inorganic components of bones by locally lowering the pH (as low as 3.9–4.5), leading to the dissolution of calcium phosphate crystals (30).

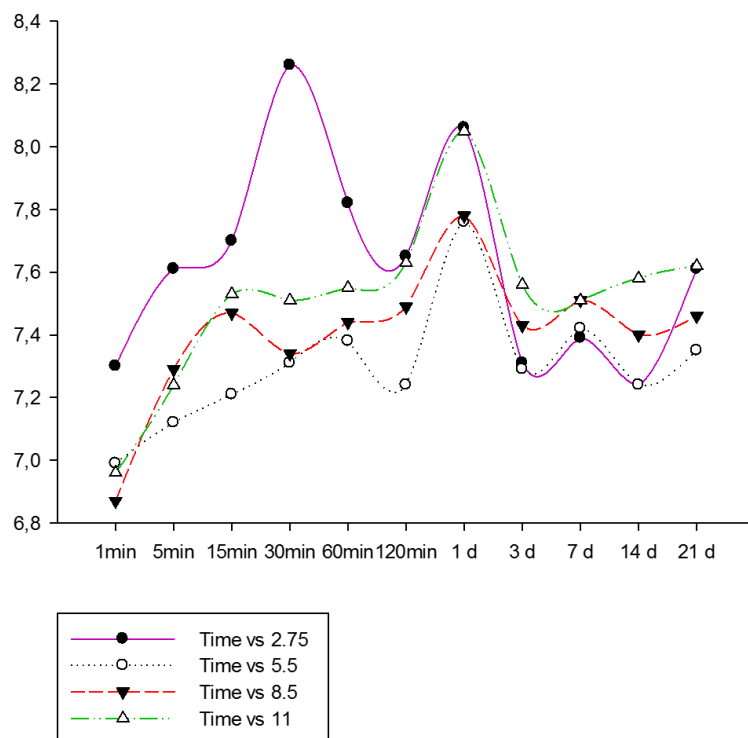
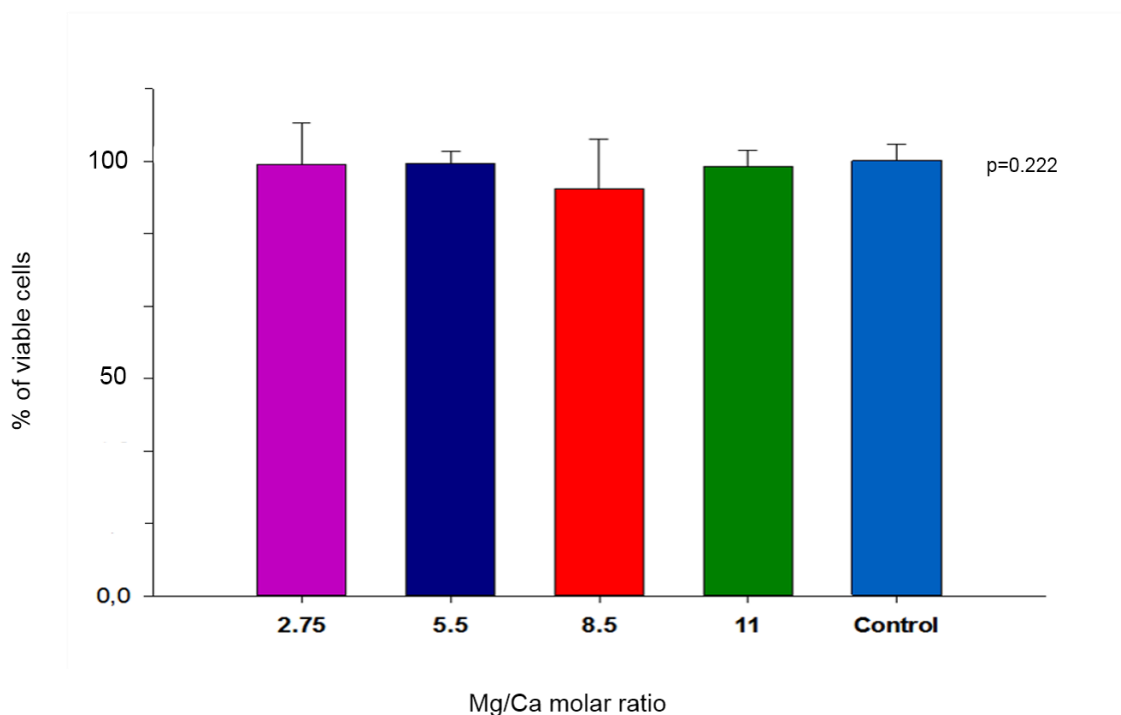


Fig. 4. pH modification of all groups in a time interval of 1 minute at 21 days of measurement

### 3.5 Cell viability

None of the samples showed any significant toxicity towards the MC3T3-E1 cells after 72 h. The results of cell viability performed by the SRB assay are shown in Fig. 5. Cell viability was higher than 90% for all tested groups, without statistical difference among them ( $p = 0.222$ ).

Zima *et al* (31) indicated that MgCHA and calcite, combined with highly reactive  $\alpha$ -TCP, enhanced the cell viability compared with only  $\alpha$ -TCP-based material.



**Fig. 5.** Cell viability and standard deviation values (performed by SRB assay) of tested groups. Different capital letter indicates statistical difference among columns ( $p < .005$ ).

Hydroxyapatite biomaterials can be acquired by following different routes that can provide precise features for a specific purpose. Nevertheless, none of them can cover all possible requests (32). Biomaterials based on calcium carbonate phosphates doped with  $Mg^{2+}$  can be considered a new generation medicinal substance for drug delivery (17). Composition is known to affect selected material properties, because they are the factors on which direct control can be applied. Furthermore, the addition of Mg to  $\beta$ -TCP promotes several effects, such as decreased crystallinity and solubility, increased densification, mechanical strength, and thermal stability, improved osteoblast adhesion and proliferation and reduced osteoclast differentiation (33,34).

For this purpose, four granule compositions were produced, with 2.75, 5.5, 8.5, and 11 Mg/Ca ratios. The prevalent methods applied to achieve HA usually require a relatively long time and elaborate processing conditions such as high pH and temperature, or ultra-sonication, which commonly result in HA with properties differing from biological apatite (32). The biodegradation of TCP is also much better than that of hydroxyapatite, which is more valuable for bone reconstruction. *In vivo*, they can be degraded and absorbed by the dissolution of

body fluids and phagocytosis of cells (35). Therefore, the aim was to develop a fast and low-cost method to obtain a biomaterial with better properties and a wide range of applications. In the method developed by Qin *et al* and modified in this study, the addition of sodium and chloride ions could keep the obtained solution clear. These ions also inhibit precipitation during the preparation.

Enhancing the solid phase of the calcium phosphate paste may improve injectability by changing the powder permeability and maximum solid volume fraction (SVF<sub>max</sub>), which plays a significant role in this characteristic (36). Decreasing particle size may also reduce SVF<sub>max</sub>, due to agglomeration, and has been shown to increase the viscosity of calcium phosphate. A reduction in particle size would reduce permeability due to an increase in surface area, which is favorable for enhancing injectability. Likewise, particle shape has been shown to affect injectability, with spherical calcium phosphate particles having better injectability than irregular particles (36,37). The opportunity to aggregate the mechanical strength (or decreasing porosity) using a specific particle size or a combination of different particle sizes has been well accepted in previous studies. Small particles also fill the void spaces between large particles without expanding the overall system volume (28). In addition, the spherical shapes of the reaction particles were easily achieved by adjusting the amount of magnesium. In smaller proportions of magnesium, the calcium phosphate granules obtained were differently shaped. The association between particle size and permeability was also observed in a previous study (15).

Previous studies (38–40) have reported that autogenous bone resorbed rapidly *in vivo*, combined with the morbidity of the donor site; and both xenograft and biphasic calcium phosphate were able to stimulate ectopic bone formation. Thus, these recently developed synthetic bone grafts have the potential to induce ectopic bone formation similar to xenografted mineral bone. Doping  $\beta$ -TCP phases by ions of biological interest, such as Mg, must guide not only the cellular response, but also the mechanism and kinetics of resorption of the material (30). In order for the use of the Mg to be feasible for orthopedic applications, incorporating the Mg with CaPs allows controlled degradation to match the rates of bone healing (33). Generally, doped samples showed significantly better bone



regeneration under cyclic loading conditions than pure TCP specimens (41) when tested *in vivo*.

Therefore, magnesium is an active dopant for the synthesis of various types of calcium phosphate phases. This study provides an insight into the potential of improving the synthesis possibilities for optimizing calcium phosphates, which can be used for bone graft function based on clinical requirements. Moreover, additional calcination treatments may be tested to improve the characteristics of biomaterials. *In vivo* experiments and degradation rates can be assessed, as well as the encapsulation and local drug distribution.

#### **4. Conclusions**

This study proposes a novel synthesis based on the conventional wet method, which is a simple, low-temperature, high-yield synthetic formation of magnesium-doped calcium phosphate for bone graft substitutes. The results indicated that Mg/Ca ratios of 8.5 and 11 are promising for applications in dentistry. However, supplementary *in vitro* and *in vivo* studies are necessary to better understand the interaction between the material and the oral environment.

#### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration [Internet]. Vol. 81, Bone. Elsevier Inc.; 2015. p. 112–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.007>
2. Barone A, Ricci M, Calvo-Guirado JL, Covani U. Bone remodelling after regenerative procedures around implants placed in fresh extraction sockets: An experimental study in Beagle dogs. Vol. 22, Clinical Oral Implants Research. 2011. p. 1131–7.
3. Li Y, Jiang T, Zheng L, Zhao J. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) induced by three calcium phosphate ceramic (CaP) powders: A comparative study. Mater Sci Eng C. 2017;80:296–300.
4. Rh. Owen G, Dard M, Larjava H. Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. Vol. 106, Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials. 2018. p. 2493–512.
5. Yamada M, Egusa H. Current bone substitutes for implant dentistry [Internet]. Vol. 62, Journal of Prosthodontic Research. Japan Prosthodontic Society; 2018. p. 152–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2017.08.010>
6. Wu C, Pan W, Feng C, Su Z, Duan Z, Zheng Q, et al. Grafting materials for alveolar cleft reconstruction: a systematic review and best-evidence synthesis. Vol. 47, International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2018. p. 345–56.
7. Bohner M, Tadier S, van Garderen N, de Gasparo A, Döbelin N, Baroud G. Synthesis of spherical calcium phosphate particles for dental and orthopedic applications. Vol. 3, Biomater. 2013. p. 1–15.
8. Ebrahimi M, Botelho MG, Dorozhkin S V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. Vol. 71, Materials Science and Engineering C. Elsevier B.V.; 2017. p. 1293–312.
9. Christel T, Geffers M, Klammert U, Nies B, Höß A, Groll J, et al. Fabrication and cytocompatibility of spherical magnesium ammonium phosphate granules. Mater Sci Eng C [Internet]. 2014;42:130–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.023>
10. Lin K, Wu C, Chang J. Acta Biomaterialia Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. Acta Biomater [Internet]. 2014;10(10):4071–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.017>
11. Ataol S, Tezcaner A, Duygulu O, Keskin D, Machin NE. Synthesis and characterization of nanosized calcium phosphates by flame spray pyrolysis, and their effect on osteogenic differentiation of stem cells. J Nanoparticle Res. 2015;17(2).
12. Trbakovic A, Hedenqvist P, Mellgren T, Ley C, Hilborn J, Ossipov D, et al. A new synthetic granular calcium phosphate compound induces new bone in a sinus lift rabbit model. J Dent. 2018;70:31–9.
13. Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T. Histological and

- histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(9):961–70.
14. Eliaz N, Metoki N. Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials (Basel)*. 2017;10(4).
  15. Qin T, Han Y, Zhang P, Hassan Wani I, Nikolajeff F, Leifer K, et al. Template-free synthesis of phosphate-based spheres via modified supersaturated phosphate buffer solutions. *J Mater Sci Mater Med.* 2017;28(7).
  16. Ghosh R, Sarkar R. Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route. *Mater Sci Eng C.* 2016;67:345–52.
  17. Fedorovna Koroleva L, Dobrinskaya MN, Kamantsev IS. Doped calcium carbonate-phosphate used for bone tissue technology. *Integr Clin Med.* 2017;1(2):1–7.
  18. Champion E. Sintering of calcium phosphate bioceramics [Internet]. Vol. 9, *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc.; 2013. p. 5855–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.029>
  19. Taz M, Bae SH, Jung H II, Cho HD, Lee BT. Bone regeneration strategy by different sized multichanneled biphasic calcium phosphate granules: In vivo evaluation in rabbit model. *J Biomater Appl.* 2018;32(10):1406–20.
  20. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior [Internet]. Vol. 9, *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc.; 2013. p. 8037–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014>
  21. Sadowska JM, Guillem-Marti J, Espanol M, Stähli C, Döbelin N, Ginebra MP. In vitro response of mesenchymal stem cells to biomimetic hydroxyapatite substrates: A new strategy to assess the effect of ion exchange. *Acta Biomater* [Internet]. 2018;76:319–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.06.025>
  22. Kalantari E, Naghib SM, Iravani NJ, Esmaeili R, Naimi-Jamal MR, Mozafari M. Biocomposites based on hydroxyapatite matrix reinforced with nanostructured monticellite (CaMgSiO<sub>4</sub>) for biomedical application: Synthesis, characterization, and biological studies. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2019;105(February):109912. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109912>
  23. Xia W, Grandfield K, Schwenke A, Engqvist H. Synthesis and release of trace elements from hollow and porous hydroxyapatite spheres. *Nanotechnology.* 2011;22(30).
  24. Maazouz Y, Rentsch I, Lu B, Santoni BLG, Doebelin N, Böhner M. In vitro measurement of the chemical changes occurring within  $\beta$ -tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Acta Biomater* [Internet]. 2020;102:440–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.035>
  25. Daltin AL, Beaufils S, Rouillon T, Millet P, Chopart JP. Calcium phosphate powder synthesis by out-of-phase pulsed sonoelectrochemistry. *Ultrason Sonochem.* 2019;58(November 2018).
  26. Ebrahimi M, Botelho M, Lu W, Monmaturapoj N. Synthesis and

- characterization of biomimetic bioceramic nanoparticles with optimized physicochemical properties for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2019;107(8):1654–66.
27. Malmström J, Adolfsson E, Arvidsson A, Thomsen P. Bone response inside free-form fabricated macroporous hydroxyapatite scaffolds with and without an open microporosity. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2007;9(2):79–88.
  28. Spath S, Drescher P, Seitz H. Impact of particle size of ceramic granule blends on mechanical strength and porosity of 3D printed scaffolds. *Materials (Basel)*. 2015;8(8):4720–32.
  29. Pina S, Torres PMC, Ferreira JMF. Injectability of brushite-forming Mg-substituted and Sr-substituted  $\alpha$ -TCP bone cements. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(2):431–8.
  30. Gallo M, Le Gars Santoni B, Douillard T, Zhang F, Gremillard L, Dolder S, et al. Effect of grain orientation and magnesium doping on  $\beta$ -tricalcium phosphate resorption behavior. *Acta Biomater* [Internet]. 2019;89:391–402. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.045>
  31. Zima A, Czechowska J, Siek D, Olkowski R, Noga M, Lewandowska-Szumieł M, et al. How calcite and modified hydroxyapatite influence physicochemical properties and cytocompatibility of alpha-TCP based bone cements. *J Mater Sci Mater Med*. 2017;28(8):1–12.
  32. Turon P, del Valle LJ, Alemán C, Puiggali J. Biodegradable and biocompatible systems based on hydroxyapatite nanoparticles. *Appl Sci*. 2017;7(1).
  33. Ballouze R, Marahat MH, Mohamad S, Saidin NA, Kasim SR, Ooi JP. Biocompatible magnesium-doped biphasic calcium phosphate for bone regeneration. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2021;(January):1–10.
  34. Arkin VHR, Narendrakumar U, Madhyastha H, Manjubala I. Characterization and in Vitro evaluations of injectable calcium phosphate cement doped with magnesium and strontium. *ACS Omega*. 2021;
  35. Gu Y, Zhang J, Zhang X, Liang G, Xu T, Niu W. Three-dimensional Printed Mg-Doped  $\beta$ -TCP Bone Tissue Engineering Scaffolds: Effects of Magnesium Ion Concentration on Osteogenesis and Angiogenesis In Vitro. *Tissue Eng Regen Med*. 2019;16(4):415–29.
  36. O'Neill R, McCarthy HO, Montufar EB, Ginebra MP, Wilson DI, Lennon A, et al. Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements. *Acta Biomater*. 2017;50:1–19.
  37. Matamoros-Veloza A, Hossain KMZ, Scammell BE, Ahmed I, Hall R, Kapur N. Formulating injectable pastes of porous calcium phosphate glass microspheres for bone regeneration applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020;102(July 2019).
  38. Miron RJ, Zhang Q, Sculean A, Buser D, Pippenger BE, Dard M, et al. Osteoinductive potential of 4 commonly employed bone grafts. *Clin Oral Investig*. 2016;20(8):2259–65.
  39. Miron RJ, Sculean A, Shuang Y, Bosshardt DD, Gruber R, Buser D, et al. Osteoinductive potential of a novel biphasic calcium phosphate bone graft in comparison with autographs, xenografts, and DFDBA. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(6):668–75.
  40. Zhang Q, Jing D, Zhang Y, Miron R. Histomorphometric Study of New

- Bone Formation Comparing Defect Healing with Three Bone Grafting Materials: The Effect of Osteoporosis on Graft Consolidation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018;
41. Samanta SK, Devi KB, Das P, Mukherjee P, Chanda A, Roy M, et al. Metallic ion doped tri-calcium phosphate ceramics: Effect of dynamic loading on in vivo bone regeneration. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2019;96(February):227–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.04.051>

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre os enxertos ósseos, os sintéticos são de particular interesse devido ao seu suprimento ilimitado e propriedades reprodutíveis (MAAZOUZ *et al.*, 2020). Há uma grande variedade de métodos para a preparação de partículas de fosfatos de cálcio, mas poucas delas satisfatórias em termos econômicos principalmente devido aos diversos materiais necessários na síntese e aos processos caros e complexos (DALTIM *et al.*, 2019). O método por via úmida é vantajoso para controle de morfologia e tamanho do pó de fosfato de cálcio (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013). Por outro lado, baixas temperaturas podem afetar a eficiência da reação e deixar impurezas em diferentes fases de fosfatos de cálcio (ATAOL *et al.*, 2015). Idealmente, esse material não pode ser deslocado do local de implantação após compressão do tecido adjacente ou ser lavado por fluidos corporais, e ainda deve manter sua coesão após a implantação (PETTA *et al.*, 2016). A adequada capacidade de injeção de um cimento de fosfato de cálcio também pode estar relacionada com sua composição (PINA; TORRES; FERREIRA, 2010) e morfologia (SPATH; DRESCHER; SEITZ, 2015). Também há relação entre temperaturas de síntese mais baixas com menor tamanho do grão e maior área superficial (EBRAHIMI *et al.*, 2019; MAAZOUZ *et al.*, 2020; MALMSTRÖM *et al.*, 2007).

A dopagem de elementos em materiais baseados em hidroxiapatita, que estão associados com a performance de funções metabólicas importantes, bem como atividade antibacteriana, parece ser interessante (TURLYBEKULY *et al.*, 2019). Na presente tese, foram sintetizadas e analisadas quatro composições de grânulos de fosfato de cálcio com diferentes proporções Mg/Ca, a fim de avaliar sua capacidade de produzirem partículas esféricas, capazes de serem usadas

como substitutos ósseos. Apesar dos avanços feitos nos últimos anos, o modelo dos enxertos ósseos sintéticos que superem o osso autógeno permanece um desafio (SADOWSKA *et al.*, 2018).

As imagens de MEV demonstraram uma grande influência da quantidade de magnésio na morfologia do fosfato de cálcio. Resultado semelhante foi encontrado por QIN *et al* (2017).

O  $\beta$ -TCP possui uma excelente reabsorção no meio biológico, havendo substituição progressiva de tecido natural, com degradação gradual do material implantado (GOSH *et al.* 2016).

No estudo de SADOWSKA *et al.* (2018), os resultados demonstraram que células mesenquimais de ratos são altamente sensíveis à flutuação iônica causada pelo biomaterial no meio de cultura celular, alcançando níveis citotóxicos que impediriam o estudo da interação célula-material. Paradoxalmente, as mesmas características topográficas e químicas que são responsáveis pela excelente resposta *in vivo* (nanoestrutura, área superficial específica grande, deficiência em cálcio e baixa cristalinidade) causam sua pobre resposta *in vitro*. Em nosso trabalho, o fosfato de cálcio dopado com magnésio em todas as proporções testadas demonstrou alta viabilidade celular, o que é corroborado por estudo prévio (ZIMA *et al.*, 2017). A dopagem de fases de fosfato de cálcio por íons de interesse biológico, tal como o magnésio, pode guiar não apenas a resposta celular, mas também toda a cinética de reabsorção do material (GALLO *et al.*, 2019). Amostras dopadas podem mostrar regeneração óssea significativamente maior ao receberem cargas cíclicas quando comparadas com amostras puras (SAMANTA *et al.*, 2019). O estudo de

GALLO *et al* (2019) concluiu que partículas de  $\beta$ -TCP puras são maiores que as dopadas. Em nosso trabalho, verificamos que a quantidade de Mg presente influencia o tamanho do grão em uma proporção inversa. Por este motivo, o próximo passo a seguir é aplicar esses mesmos materiais *in vivo*, para maior conhecimento das interações do mesmo com os tecidos e fluidos corporais.



## REFERÊNCIAS

AMBARD, A. J.; MUENINGHOFF, L. Calcium phosphate cement: Review of mechanical and biological properties. **Journal of Prosthodontics**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 321–328, 2006.

ARKIN, V. H. R. et al. Characterization and in Vitro evaluations of injectable calcium phosphate cement doped with magnesium and strontium. **ACS Omega**, [s. l.], 2021.

ATAOL, S. et al. Synthesis and characterization of nanosized calcium phosphates by flame spray pyrolysis, and their effect on osteogenic differentiation of stem cells. **Journal of Nanoparticle Research**, [s. l.], v. 17, n. 2, 2015.

BALLOUZE, R. et al. Biocompatible magnesium-doped biphasic calcium phosphate for bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [s. l.], n. January, p. 1–10, 2021.

BARONE, A. et al. **Bone remodelling after regenerative procedures around implants placed in fresh extraction sockets: An experimental study in Beagle dogs**, 2011.

BOHNER, M. et al. **Synthesis of spherical calcium phosphate particles for dental and orthopedic applications**, 2013.

CHAMPION, E. **Sintering of calcium phosphate bioceramics**, Acta Materialia Inc., 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.029>>

CHRISTEL, T. et al. Fabrication and cytocompatibility of spherical magnesium ammonium phosphate granules. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 42, p. 130–136, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.023>>

DALTIN, A. L. et al. Calcium phosphate powder synthesis by out-of-phase pulsed sonoelectrochemistry. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 58, n. November 2018, 2019.

DOUARD, N. et al. Impact of the chemical composition of poly-substituted hydroxyapatite particles on the in vitro pro-inflammatory response of macrophages. **Biomedical Microdevices**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 1–9, 2016.

EBRAHIMI, M. et al. Synthesis and characterization of biomimetic bioceramic nanoparticles with optimized physicochemical properties for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, [s. l.], v. 107, n. 8, p. 1654–1666, 2019.

EBRAHIMI, M.; BOTELHO, M. G.; DOROZHKIN, S. V. **Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research**, Elsevier B.V., 2017.

ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. **Materials**, [s. l.], v. 10, n. 4, 2017.

FEDOROVNA KOROLEVA, L.; DOBRINSKAYA, M. N.; KAMANTSEV, I. S. Doped calcium carbonate-phosphate used for bone tissue technology. **Integrative Clinical Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 1–7, 2017.

GALLINETTI, S.; CANAL, C.; GINEBRA, M. P. Development and characterization of biphasic hydroxyapatite/ $\beta$ -TCP cements. **Journal of the American Ceramic Society**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 1065–1073, 2014.

GALLO, M. et al. Effect of grain orientation and magnesium doping on  $\beta$ -tricalcium phosphate resorption behavior. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 89, p. 391–402, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.045>>

GARCÍA-GARETA, E.; COATHUP, M. J.; BLUNN, G. W. **Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration**, Elsevier Inc., 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.007>>

GHOSH, R.; SARKAR, R. Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 67, p. 345–352, 2016.

GU, Y. et al. Three-dimensional Printed Mg-Doped  $\beta$ -TCP Bone Tissue Engineering Scaffolds: Effects of Magnesium Ion Concentration on Osteogenesis and Angiogenesis In Vitro. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 415–429, 2019.

ITO, T. et al. Promotion of bone regeneration on titanium implants through a chemical treatment process using calcium phosphate slurry: Microscopic analysis, cellular response, and animal experiment. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [s. l.], v. 106, n. 7, p. 2716–2724, 2018.

JUIGNET, L. et al. Macrotopographic closure promotes tissue growth and osteogenesis in vitro. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 53, p. 536–548, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.02.037>>

KALANTARI, E. et al. Biocomposites based on hydroxyapatite matrix reinforced with nanostructured monticellite ( $\text{CaMgSiO}_4$ ) for biomedical application: Synthesis, characterization, and biological studies. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 105, n. February, p. 109912, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109912>>

KHURANA, K. et al. Injectable calcium phosphate foams for the delivery of Pitavastatin as osteogenic and angiogenic agent. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [s. l.], n. May, p. 1–11, 2019.

LI, Y. et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) induced by three calcium phosphate ceramic (CaP) powders: A comparative study. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 80, p. 296–300, 2017.

LIN, K.; WU, C.; CHANG, J. Acta Biomaterialia Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 4071–4102, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.017>>

LUCAS-APARICIO, J. et al. Silicon-calcium phosphate ceramics and silicon-calcium phosphate cements: Substrates to customize the release of antibiotics

according to the idiosyncrasies of the patient. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 106, n. January 2019, p. 110173, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110173>>

MAAZOUZ, Y. et al. In vitro measurement of the chemical changes occurring within  $\beta$ -tricalcium phosphate bone graft substitutes. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 102, p. 440–457, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.035>>

MALMSTRÖM, J. et al. Bone response inside free-form fabricated macroporous hydroxyapatite scaffolds with and without an open microporosity. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 79–88, 2007.

MASOUDI RAD, M. et al. Fabrication and characterization of two-layered nanofibrous membrane for guided bone and tissue regeneration application. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 80, p. 75–87, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.125>>

MATAMOROS-VELOZA, A. et al. Formulating injectable pastes of porous calcium phosphate glass microspheres for bone regeneration applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [s. l.], v. 102, n. July 2019, 2020.

MELLGREN, T. et al. Calcium Phosphate Microspheres as a Delivery Vehicle for Tooth-Bleaching Agents. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 283–288, 2018.

MIRON, R. J. et al. Osteoinductive potential of a novel biphasic calcium phosphate bone graft in comparison with autographs, xenografts, and DFDBA. **Clinical Oral Implants Research**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 668–675, 2016. a.

MIRON, R. J. et al. Osteoinductive potential of 4 commonly employed bone grafts. **Clinical Oral Investigations**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 2259–2265, 2016. b.

MORDENFELD, A. et al. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. **Clinical Oral Implants Research**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 961–970, 2010.

MOSEKE, C. et al. Low temperature fabrication of spherical brushite granules by cement paste emulsion. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 2631–2637, 2012.

MOSEKE, C.; SARATIS, V.; GBURECK, U. Injectability and mechanical properties of magnesium phosphate cements. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 2591–2598, 2011.

O'NEILL, R. et al. Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 50, p. 1–19, 2017.

OKADA, M.; MATSUMOTO, T. Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications. **Japanese Dental Science Review**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 85–95, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2015.03.004>>

PETTA, D. et al. Calcium phosphate/thermoreponsive hyaluronan hydrogel composite delivering hydrophilic and hydrophobic drugs. **Journal of Orthopaedic Translation**, [s. l.], v. 5, p. 57–68, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jot.2015.11.001>>

PINA, S.; TORRES, P. M. C.; FERREIRA, J. M. F. Injectability of brushite-forming Mg-substituted and Sr-substituted  $\alpha$ -TCP bone cements. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 431–438, 2010.

QIN, T. et al. Template-free synthesis of phosphate-based spheres via modified supersaturated phosphate buffer solutions. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 7, 2017.

RH. OWEN, G.; DARD, M.; LARJAVA, H. **Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects**, 2018.

RODRÍGUEZ-LUGO, V. et al. Wet chemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite flakes: Effect of pH and sintering temperature on structural and morphological properties. **Royal Society Open Science**, [s. l.], v. 5, n. 8, 2018.

RUMPLER, M. et al. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth.

**Journal of the Royal Society Interface**, [s. l.], v. 5, n. 27, p. 1173–1180, 2008.

SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 7591–7621, 2013.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>>

SADOWSKA, J. M. et al. In vitro response of mesenchymal stem cells to biomimetic hydroxyapatite substrates: A new strategy to assess the effect of ion exchange. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 76, p. 319–332, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.06.025>>

SAMANTA, S. K. et al. Metallic ion doped tri-calcium phosphate ceramics:

Effect of dynamic loading on in vivo bone regeneration. **Journal of the**

**Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [s. l.], v. 96, n. February, p.

227–235, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.04.051>>

SAMAVEDI, S.; WHITTINGTON, A. R.; GOLDSTEIN, A. S. **Calcium**

**phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties**

**and their influence on cell behavior**, Acta Materialia Inc., 2013. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014>>

SPATH, S.; DRESCHER, P.; SEITZ, H. Impact of particle size of ceramic granule blends on mechanical strength and porosity of 3D printed scaffolds.

**Materials**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 4720–4732, 2015.

TAO, Z. et al. Effects of strontium-modified calcium phosphate cement

combined with bone morphogenetic protein-2 on osteoporotic bone defects

healing in rats. **Journal of Biomaterials Applications**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 3–

10, 2018.

TAZ, M. et al. Bone regeneration strategy by different sized multichanneled biphasic calcium phosphate granules: In vivo evaluation in rabbit model.

**Journal of Biomaterials Applications**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 1406–1420, 2018.

TRBAKOVIC, A. et al. A new synthetic granular calcium phosphate compound

induces new bone in a sinus lift rabbit model. **Journal of Dentistry**, [s. l.], v. 70,

n. March 2017, p. 31–39, 2018. a. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.12.009>>

TRBAKOVIC, A. et al. A new synthetic granular calcium phosphate compound induces new bone in a sinus lift rabbit model. **Journal of Dentistry**, [s. l.], v. 70, p. 31–39, 2018. b.

TURLYBEKULY, A. et al. Synthesis, characterization, in vitro biocompatibility and antibacterial properties study of nanocomposite materials based on hydroxyapatite-biphasic ZnO micro- and nanoparticles embedded in Alginate matrix. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 104, n. March, p. 109965, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109965>>

TURON, P. et al. Biodegradable and biocompatible systems based on hydroxyapatite nanoparticles. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017.

VOLKMER, T. M. et al. Novel method for the obtainment of nanostructured calcium phosphate cements: Synthesis, mechanical strength and cytotoxicity. **Powder Technology**, [s. l.], v. 235, p. 599–605, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2012.10.025>>

WANG, J. et al. Nano-hydroxyapatite coating promotes porous calcium phosphate ceramic-induced osteogenesis via BMP/SMAD signaling pathway. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 14, p. 7987–8000, 2019.

WU, C. et al. **Grafting materials for alveolar cleft reconstruction: a systematic review and best-evidence synthesis**, 2018.

WU, J.; LI, B.; LIN, X. **Histological outcomes of sinus augmentation for dental implants with calcium phosphate or deproteinized bovine bone: a systematic review and meta-analysis**, 2016.

XIA, W. et al. Synthesis and release of trace elements from hollow and porous hydroxyapatite spheres. **Nanotechnology**, [s. l.], v. 22, n. 30, 2011.

YAMADA, M.; EGUSA, H. **Current bone substitutes for implant dentistry**, Japan Prosthodontic Society, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2017.08.010>>

ZHANG, Q. et al. Histomorphometric Study of New Bone Formation Comparing

Defect Healing with Three Bone Grafting Materials: The Effect of Osteoporosis on Graft Consolidation. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, [s. l.], 2018.

ZIMA, A. et al. How calcite and modified hydroxyapatite influence physicochemical properties and cytocompatibility of alpha-TCP based bone cements. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1–12, 2017.