

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Tese

**Síntese e caracterização de novo hidrogel compósito com hidroxiapatita de
estrôncio para regeneração óssea**

Guillermo Grazioli

Pelotas, 2020

Guillermo Grazioli

Síntese e caracterização de novo hidrogel compósito com hidroxiapatita de estrôncio para regeneração óssea

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Biomateriais e Biologia Oral, ênfase Materiais Odontológicos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes

Co-orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Fernandes da Silva

Prof. Dr. André Ricardo Fajardo

Prof. Dr. Sergio as Silva Cava

Pelotas, 2020

Guillermo Grazioli

Síntese e caracterização de novo hidrogel compósito com hidroxiapatita de estrôncio
para regeneração óssea

Tese apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em
Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade
de Odontologia de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas

Data da defesa: 06 de março de 2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes

Doutor em Materiais Dentários pela Universidade Estadual de Campinas

Prof^a. Dr^a. Giana da Silveira Lima

Doutora em Odontologia (Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Marcus Cristian Muniz Conde

Doutor em Odontologia (Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Carlos Cuevas-Suárez

Doutor em Odontologia (Materiais Odontológicos) pela Universidade Federal de
Pelotas

Prof. Dr. Luiz Alexandre Chisini (Suplente)

Doutor em Clínica Odontológica (Dentística e Cariologia) pela Universidade Federal
de Pelotas

Prof. Dr. Mateus Bertolini Fernandes dos Santos (Suplente)

Doutor em Clínica Odontológica pela Universidade Estadual de Campinas

Agradecimentos

Agradeço a minha família, pelo apoio recebido durante minha trajetória, não só durante o doutorado, mas em todas as fases de minha vida. Tudo que faço é para honrar os seus esforços.

A os meus queridos amigos, Marcus Conde e Alexandre Chisini, que me receberam desde o primeiro dia que conheci Pelotas, pela amizade e pelo apoio fundamental para que eu pudesse realizar este doutorado.

Ao meu grande amigo Cezar Zanchi, pela amizade, suporte, todas as lições de vida que aprendemos juntos nestes anos e momentos de descontração que tornaram a “caminhada” mais leve.

Ao meu amigo e parceiro Carlos Cuevas-Suárez, pela amizade e tanto conhecimento que você tem e dá aos outros sem pedir nada de retorno. Você é uma grande pessoa.

A todos os funcionários e colegas que de alguma forma contribuíram com a minha formação.

Aos meus coorientadores pelo suporte e guias para percorrer esse caminho.

Ao meu Orientador Rafael Moraes, pela parceria, apoio e paciência em me ensinar. Trabalhando com você aprendi como pesquisador e como profissional. Agradeço muito a oportunidade de ter trabalhado com você.

A Universidad de la República, Uruguay, minha casa de estudo e trabalho.

A Universidade Federal de Pelotas, e ao PPGO por ter me propiciado a oportunidade de entrar no seu programa e permitir minha formação nas suas aulas e laboratórios.

Avanti, bersaglieri, che la vittoria é nostra!

GIUSEPPE GARIBALDI (1807-1882)

Notas Preliminares

A presente tese foi redigida segundo o Manual de Normas para trabalhos acadêmicos da UFPel, adotando o nível de descrição em artigos, disponível em: http://sisbi.ufpel.edu.br/arquivos/PDF/Manual_Normas_UFPel_trabalhos_acad%C3%AAmicos.pdf

O projeto de pesquisa referente a esta Tese, foi aprovado em 14 de dezembro de 2016, pela Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Rafael Ratto de Moraes, Sergio da Silva Cava, André Ricardo Fajardo e Fernanda Geraldo Pappen.

Resumo

GRAZIOLI, Guillermo. **Síntese e caracterização de novo hidrogel compósito com hidroxiapatita de estrôncio para regeneração óssea**. Orientador: Rafael Ratto de Moraes. 2020. 72 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A formação rápida de um novo tecido ósseo é pré-requisito para restauração estética e funcional do tecido perdido. Levando isso em consideração, o objetivo deste trabalho foi preparar um biomaterial potencialmente aplicável para regeneração óssea à base de uma matriz de hidrogel modificada com partículas de Hidroxiapatita (HA) e Hidroxiapatita de Estrôncio (HASr). Para a síntese das partículas, o método de precipitação húmida e calcinação foi utilizado. No caso da hidroxiapatita de estrôncio, 50 mol% do cálcio foi substituído por nitrato de estrôncio na fase de precipitação. As partículas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (MEV-EDX – morfologia e composição química), difração de raios-X (DRX) e Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR). Os hidrogéis foram preparados a partir de misturas dos polímeros poli(álcool vinílico) (PVA) e sulfato de condroitina (SC) utilizando a técnica de congelamento/descongelamento. Durante esse processo, diferentes quantidades de HA ou HASr (0, 5, 10 ou 15% em massa) foram adicionadas à formulação dos hidrogéis. Os hidrogéis obtidos (com e sem partículas) foram caracterizados por FTIR, MEV-EDX e micro tomografia computadorizada (micro-CT – porosidade do hidrogel). Além disso, foram realizados ensaios *in vitro* com esses hidrogéis a fim de avaliar suas propriedades mecânicas, capacidade de absorção de líquidos e citotoxicidade. O MEV-EDX confirmou uma distribuição homogênea de Ca^{2+} e Sr^{2+} ao longo das estruturas das partículas. Já as análises de DRX apresentaram padrões de difração correspondentes à HA e HASr. A análise de FTIR dos hidrogéis permitiu comprovar a formação da rede polimérica do hidrogel de PVA/SC, resultado da reticulação física das cadeias de PVA durante as etapas de congelamento/descongelamento. Ainda, as análises de FTIR confirmaram a presença das partículas (HA ou HASr) nas matrizes de hidrogel. A porosidade e distribuição homogênea das partículas foi confirmada pelo MEV-EDX mostrando presença de íons Ca^{2+} e Sr^{2+} nos hidrogéis independentemente da concentração. O micro-CT exibiu uma porosidade total de 30% no hidrogel controle (sem partículas) e uma tendência a reduzir a porosidade total à medida que a proporção de HA ou HASr aumentava. A resistência à compressão do hidrogel compósito aumentou com a adição de partículas. O teste de viabilidade celular revelou que todos os hidrogéis preparados são atóxicos e ainda permitem um aumento na quantidade de células em todos os grupos, incluindo o hidrogel controle (sem partículas). Em conclusão, um hidrogel composto modificado com até 15% em massa de partículas de HA ou HASr foi sintetizado com sucesso com propriedades físico-químicas aprimoradas em comparação com o hidrogel controle, mostrando também características manipulativas promissoras. Os próximos passos incluirão ensaios de fosfatase

alcalina para observar a capacidade dos hidrogéis de induzir a diferenciação óssea e testes *in vivo* para regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico em um modelo animal, buscando avaliar a futura aplicação clínica.

Palavras-chave: substitutos ósseos; hidrogel; hidrogéis compósitos; estrôncio; hidroxiapatita; porosidade; viabilidade celular; biocompatibilidade.

Abstract

GRAZIOLI, Guillermo. **Synthesis and characterization of a novel composite hydrogel with strontium-doped hydroxyapatite for bone regeneration**. Advisor: Rafael Ratto de Moraes. 2020. 72 p. Thesis (PhD in Dentistry) – Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Rapid formation of new bone is a prerequisite for aesthetic and functional restoration of lost tissue. Taking this into account, the objective of this work was to prepare a biomaterial potentially applicable for bone regeneration based on a hydrogel matrix modified with Hydroxyapatite (HA) and Strontium Hydroxyapatite (HASr) particles. For the particle's synthesis, the wet precipitation and calcination method was used. In the case of strontium hydroxyapatite, 50 mol% of calcium was replaced by strontium nitrate in the precipitation phase. The particles were characterized by scanning electron microscopy and X-ray dispersive energy spectroscopy (SEM-EDX - morphology and chemical composition), X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The hydrogels were prepared from mixtures of poly(vinyl alcohol) polymers (PVA) and chondroitin sulfate (CS) using the freeze/thaw technique. During this process, different amounts of HA or HASr (0, 5, 10 or 15% in mass) were added to the hydrogel formulation. The obtained hydrogels (with and without particles) were characterized by FTIR, MEV-EDX and computed microtomography (micro-CT - porosity of the hydrogel). In addition, *in vitro* tests were performed with these hydrogels in order to evaluate their mechanical properties, liquid absorption capacity and cytotoxicity. MEV-EDX confirmed a homogeneous distribution of Ca and Sr along the particle structures. The XRD analyzes showed diffraction patterns corresponding to HA and HASr. The FTIR analysis of the hydrogels showed the formation of the polymeric network of the PVA/CS hydrogel, resulting from the physical crosslinking of the PVA chains during the freezing/thawing steps. In addition, FTIR analyzes confirmed the presence of particles (HA or HASr) in hydrogel matrices. The porosity and homogeneous distribution of the particles was confirmed by MEV-EDX showing the presence of Ca^{2+} and Sr^{2+} ions in hydrogels regardless of concentration. The micro-CT exhibited a total porosity of 30% in the control hydrogel (without particles) and a tendency to reduce total porosity as the proportion of HA or HASr increased. The compressive strength of the composite hydrogel increased with the addition of particles. The cell viability test revealed that all prepared hydrogels are non-toxic and still increase the number of cells in all groups, including the control hydrogel (without particles). In conclusion, a modified hydrogel with up to 15% in mass of HA or HASr particles has been successfully synthesized with improved physicochemical properties compared to the control hydrogel, also showing promising manipulative characteristics. The next steps should include alkaline phosphatase assays to observe the ability of hydrogels to induce bone differentiation and *in vivo* tests for bone regeneration on critical size defects in an animal model, in an attempt to assess their future clinical application.

Key-words: bone substitutes; hydrogel; composite hydrogels; strontium; hydroxyapatite; porosity; cell viability; biocompatibility.

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Projeto de pesquisa.....	14
3 Relatório do trabalho de campo.....	28
4 Artigo.....	30
5 Considerações finais.....	60
Referências.....	61
Apêndices.....	66
Anexos.....	70

1 Introdução

Uma grande variedade de materiais como substitutos ósseos tem sido utilizada nos últimos anos para cirurgia periodontal e maxilofacial. A formação rápida e previsível de novo osso é pré-requisito para restauração estética e funcional do tecido perdido devido à perda de dentes e diferentes patologias associadas à perda de osso, como rejeições oncológicas, fraturas, traumas, etc. Na odontologia restauradora o uso mais frequente é para criar um volume ósseo suficiente para receber um implante dentário, dependendo a sua taxa de sucesso do volume e qualidade óssea da área. (BENIC; HÄMMERLE, 2014; PARK; KANG; HANAWA, 2016).

A engenharia tecidual, área da medicina regenerativa que funde os conhecimentos de biologia molecular e engenharia de materiais buscando criar novos biomateriais que possam brindar opções para a regeneração de tecidos. O microambiente, que pode ser considerado o componente e condição mais importante, é a área que rodeia uma célula e modula o comportamento celular. No tecido ósseo esse microambiente tem a função de influenciar a diferenciação óssea e o depósito da matriz extracelular, mineralização e finalmente a formação de novo tecido ósseo por parte das células nativas da área implantada. Normalmente, a função mais importante dos substitutos ósseos é o espaço tridimensional criado que permite a infiltração celular e um microambiente adequado para a diferenciação óssea das células além de manter o volume durante o processo de regeneração óssea (BENIC; HÄMMERLE, 2014; NYMAN et al., 1982).

O uso mais comum de substitutos ósseos são enxertos autólogos e alógenos, mas a morbidade do paciente e o risco de transmissão de doenças a partir desses tecidos compreende uma grande desvantagem, dando lugar aos biomateriais sintéticos os quais tem uma composição e produção controlada. O substituto ósseo tem requisitos de biocompatibilidade, biodegradabilidade, osteoindução e/ou condução, permitindo a migração e proliferação celular para criar um novo tecido ósseo (IVIGLIA et al., 2016).

Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) são materiais cerâmicos amplamente utilizados na engenharia do tecido ósseo, sendo estes concebidos normalmente como partículas ou *scaffolds* tridimensionais. Mas, além das boas propriedades e comportamento clínico demonstrado (biocompatibilidade, osteocondução), estas partículas ainda têm uma taxa de reabsorção muito lenta o que faz com que o material seja utilizado somente como um preenchimento ósseo (ALCAIDE et al., 2009; MATSUNO et al., 2010; NAGATA et al., 2009; ZHANG et al., 2009). Para contornar essa limitação, uma alternativa explorada por vários pesquisadores é a formulação de materiais compósitos entre esses materiais cerâmicos e matrizes poliméricas. A combinação de partículas cerâmicas e matrizes poliméricas proporciona muitas vantagens, em particular na área odontológica permitindo controle da forma, viscosidade e propriedades físico-mecânicas. Poucos substitutos ósseos compósitos existem no mercado, devido a sua difícil manipulação e a rápida reabsorção o que gera uma rápida perda de propriedades mecânicas e migração das partículas inorgânicas a outras áreas (ARAÚJO; LILJENBERG; LINDHE, 2010).

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais com um conteúdo substancial de água o que os torna similares aos tecidos humanos moles. Estes têm várias aplicações na área médica como, por exemplo, veículos na entrega de fármacos, como curativos, e na engenharia de tecidos (DRURY; MOONEY, 2003; SHAPIRO; OYEN, 2013, 2016). A sua similaridade estrutural com as matrizes extracelulares faz do hidrogel um candidato ideal como microambiente modelador de interações celulares; no tecido ósseo, onde a indução e os processos são controlados pelo microambiente, isto se torna particularmente importante (SHAPIRO; OYEN, 2016). Entre outras características particularmente interessantes, pode ser ressaltada a alta porosidade e maleabilidade dos hidrogéis (ANISHA et al., 2013). Além disso, a combinação de diferentes tipos e classes de polímeros possibilita criar um hidrogel com características e propriedades desejadas (ANISHA et al., 2013). Atualmente, vários hidrogéis veem sendo desenvolvidos a partir de diferentes matrizes poliméricas (ácido hialurônico, quitosana, polietileno glicol, entre outras) com modificações oriundas da adição de partículas para melhorar suas propriedades mecânicas e biológicas. Em contrapartida, uma das limitações no preparo e na aplicação deste tipo de material compósito está relacionada ao alto

custo e a complexidade inerente aos processos envolvidos nas diferentes etapas de síntese e uso (SARKAR; LEE, 2015).

Para melhorar a capacidade indutora dos biomateriais, pode-se encontrar na literatura diferentes íons utilizados para esse propósito, tais como o cálcio, zinco, estrôncio; assim, foi demonstrado que eles podem modular o efeito indutor e a capacidade de diferenciação óssea das células (BODA et al., 2017; NARDONE et al., 2015; PARK; KANG; HANAWA, 2016; PLACE et al., 2011). Particularmente, o estrôncio (Sr) é capaz de aumentar a quantidade total de novo osso e a capacidade de diferenciação celular (óssea), além de suprimir a diferenciação osteoclástica (BONNELYE et al., 2008; BRAUX et al., 2011; GENTLEMAN et al., 2010; SAIDAK; MARIE, 2012). A modificação da superfície de materiais indutores com estrôncio mostrou também um aumento na formação de tecido ósseo em modelos animais (ANDERSEN et al., 2013; BRAUX et al., 2011; ISAAC et al., 2011). A proposta sobre o mecanismo de ação do estrôncio é baseada no fato dele induzir a apoptose em osteoclastos, retardando a reabsorção óssea uma vez que ele pode ser incorporado no novo osso formado (FONSECA; BRANDI, 2010) e ativar osteoblastos capazes de incrementar a quantidade de fosfatase alcalina (BONNELYE et al., 2008; GENTLEMAN et al., 2010).

O desenvolvimento de substitutos ósseos que possam superar os enxertos autólogos e alógenos, e a criação de biomateriais sintéticos capazes de produzir novo osso de forma controlada é um importante objetivo da medicina regenerativa. Dessa forma, este estudo objetivou sintetizar e analisar um novo biomaterial baseado em um hidrogel compósito modificado com partículas de hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita de estrôncio (HASr) com potencial uso para regeneração óssea.

2 Projeto de pesquisa

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo geral

Sintetizar e analisar um novo biomaterial a base de um hidrogel compósito modificado com partículas de Hidroxiapatita e Hidroxiapatita de Estrôncio com potencial uso para regeneração óssea.

2.1.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar partículas de Hidroxiapatita e Hidroxiapatita de Estrôncio;
- Preparar hidrogéis compósitos contendo partículas de Hidroxiapatita e Hidroxiapatita de Estrôncio;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas, mecânicas e morfológicas dos hidrogéis compósitos preparados;
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade e capacidade indutora dos hidrogéis;
- Avaliar *in vivo* a capacidade óssea regenerativa dos hidrogéis.

2.2 Metodologias

Para compreender e avaliar os diferentes materiais sintetizados, a metodologia será dividida em 3 grandes fases: síntese e caracterização química, avaliação *in vitro*, e avaliação *in vivo*. A Figura 1 mostra um fluxograma do trabalho que será desenvolvido.

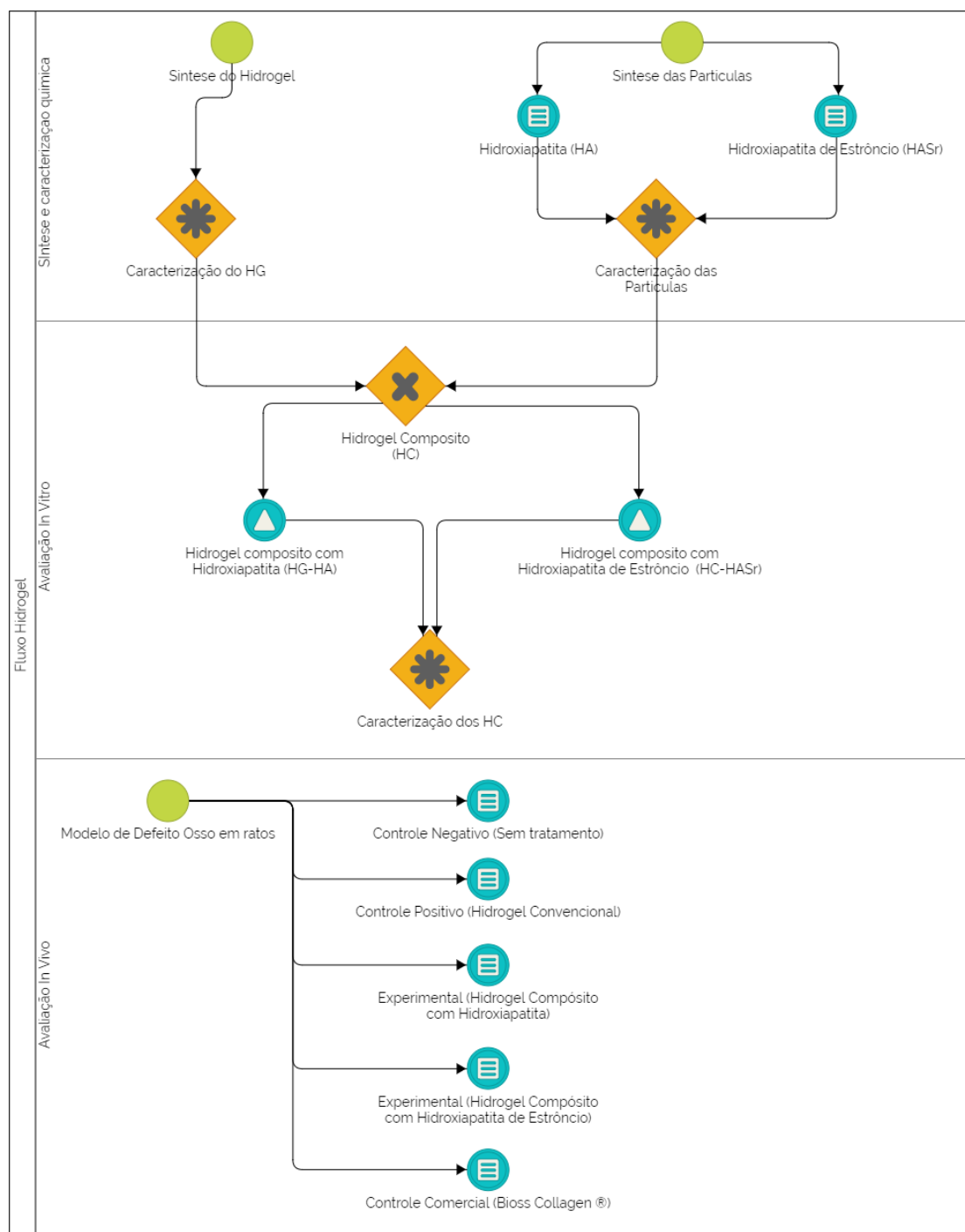


Figura 1. Fluxograma do estudo.

2.2.1 Síntese das partículas

2.2.1.1 Partículas de Hidroxiapatita (HA)

Para a síntese das partículas o método de precipitação úmida e calcinação será utilizado. Uma solução de di-hidrogênio fosfato amoníaco com adição de nitrato de cálcio sob agitação continua a 80 °C. O rádio de proporção entre os íons cálcio e

fosfato será de 1,67. O precipitado será coletado por centrifugação e lavado com água deionizada. A solução será secada num forno a 60 °C e finalmente calcinada a 300°C. O precipitado obtido será moído e peneirado para obter partículas menores a 125 µm. Finalmente o precipitado peneirado será colocado novamente no forno a 1175 °C por 2 horas.

2.2.1.2 Partículas de Hidroxiapatita de Estrôncio (HASr)

Para a síntese de hidroxiapatita de estrôncio o procedimento será muito semelhante com o procedimento da hidroxiapatita. Porém, durante o processo de precipitação 50 mols% do nitrato de cálcio será substituído por nitrato de estrôncio. Brevemente, na solução de di-hidrogênio fosfato amoníaco serão adicionados nitrato de cálcio e nitrato de estrôncio numa relação molar de 5:5. O precipitado será lavado e secado. Finalmente será moído e peneirado até obter particular menores a 125 µm e colocado no forno a 1175 °C por 2 horas.

2.2.2 Caracterização das partículas

2.2.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia dispersiva de raios-X

A avaliação morfológica das partículas será realizada com auxílio de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), da marca JEOL, modelo JSM - 6610LV (EUA) equipado com microsonda de Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX). Para a obtenção das imagens de MEV, as porções superficiais das amostras serão previamente recobertas com uma fina camada de Au em um metalizador da marca DentonVacuum, modelo Deskly (EUA). Também será utilizada a microsonda de EDX para avaliar a composição química da superfície dos materiais.

2.2.2.2 Difração de raios X (DRX)

A difração de raios-X será utilizada para identificar as fases cristalinas das partículas. Um difractômetro (D500; Siemens, Munique, Alemanha) com uma fonte de radiação Cu-K α (λ = 1,54 Å) a 40 kV e 1,75 mA. Um ângulo de varredura (2θ) variado de 20 a 50° com resolução de 0,02° e velocidade de 2° / min. será utilizado e os padrões de difração serão gravados.

2.2.3 Preparo do hidrogel controle

O hidrogel controle (sem as partículas de HA ou HASr) será preparado a partir de uma mistura de duas soluções poliméricas a qual será reticulada pela técnica de congelamento/descongelamento (DA SILVA et al., 2017). Para isso, uma solução de poli(álcool vinílico) (PVA) (15 % m/v) será preparada a partir da solubilização de 1,5 g de PVA em água destilada, mantendo a solução sob agitação magnética à temperatura de 75 °C por 24 h. A segunda solução preparada será a de sulfato de condroitina (SC) (30 % m/v) solubilizando 3,0 g do polímero em 10 mL de água destilada mantendo a mesma sob agitação magnética em temperatura ambiente por 24 h.

Posteriormente, as duas soluções serão misturadas sob agitação magnética (aproximadamente 1 h) à temperatura ambiente até obter mistura homogênea. A solução de PVA/SC será então congelada a -20 °C para iniciar o processo de reticulação do material. Para a reticulação do material serão realizados 5 ciclos de congelamento/descongelamento de 24 h de duração (16 h para congelar e 8 h para descongelar). Por último, o hidrogel formado será recuperado, lavado em água destilada e levado à estufa sob temperatura de 37 °C para secagem.

2.2.4 Caracterização do hidrogel

2.2.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia dispersiva de raios-X

Metodologia será feita como descrita anteriormente para avaliar as partículas. Porém, antes da aquisição da imagem, as amostras serão inchadas em água destilada durante a noite, depois congeladas em N₂ líquido, fraturadas cuidadosamente e secas sob vácuo. As seções fraturadas serão revestidas com ouro antes da visualização do MEV. O tamanho médio de poros do hidrogel preparado será determinado a partir de 30 poros com tamanhos aleatórios em cada amostra. A dimensão dos poros será avaliada com o auxílio do *software ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, EUA).

2.2.4.2 Micro-CT

Para quantificar a porosidade do hidrogel obtido, a análise com Micro-CT será realizada utilizando um raio monocromático com uma energia de 23,5 keV a uma distância de 5cm. Uma imagem 3D será obtida com o auxílio de um software e os voxels que representam estrutura e poros serão identificados, obtendo assim, a quantificação dos poros.

2.2.5 Preparo dos Hidrogéis Compósitos

2.2.5.1 Hidrogel com Hidroxiapatita (HHA)

Será utilizada a mesma metodologia empregada no preparo do hidrogel de PVA/SC. No entanto, após a etapa de mistura das duas soluções poliméricas, serão adicionadas quantidades específicas de HA em relação à massa total dos polímeros utilizados no preparo do hidrogel. A solução resultante será completamente homogeneizada antes do primeiro ciclo de congelamento/descongelamento. Deve ser mencionado que as quantidades de HA que serão incorporadas aos hidrogéis serão avaliadas em estudos-piloto antes da caracterização e aplicação do mesmo. Estudos preliminares serão realizados buscando-se definir a quantidade máxima de partículas que os hidrogéis podem acomodar em suas estruturas. Estudo similar será realizado com as hidroxiapatitas de estrôncio (HHASr).

2.2.5.2 Hidrogel com Hidroxiapatita de Estrôncio (HHASr)

Será utilizada a mesma metodologia descrita na seção anterior. Contudo, ao invés de HA, serão adicionadas quantidades específicas de HASr à mistura de PVA/SC ao invés de HA.

2.2.6 Caracterização in vitro do Hidrogel e Hidrogéis Compósitos

Para realizar estes testes, três grupos serão criados (Tabela 1).

Tabela 1 – Grupos experimentais *in vitro*

Grupo	Amostra
1	Hidrogel convencional (controle)
2	Hidrogel com Hidroxiapatita
3	Hidrogel com Hidroxiapatita de Estrôncio

2.2.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia dispersiva de raios-X

A metodologia será realizada como descrita anteriormente para avaliar os hidrogéis.

2.2.6.2 Micro-CT

A metodologia para avaliação da porosidade por micro-CT será realizada como descrita anteriormente para avaliar os hidrogéis.

2.2.6.3 Ensaio de compressão

Para avaliar o comportamento mecânico do hidrogel compósito, 5 corpos de prova de cada grupo serão confeccionados de forma cúbica (10 mm) sendo previamente intumescidos em solução tampão PBS (pH 7,4) por 24 h à temperatura ambiente. Será realizado assim um ensaio de compressão, utilizando um texturômetro (TA.XTplusC; Stable Micro Systems, Londres, Reino Unido) onde o limite de deformação será fixado em 50 % ou até o rompimento do corpo de prova. Os testes serão realizados a uma velocidade de 0,5 mm/s com uma célula de carga de 50N.

2.2.6.4 Absorção de líquidos

Para avaliar a capacidade de absorver e reter líquido dos hidrogéis, distintos parâmetros serão avaliados: intumescimento máximo, efeito do pH, taxa de perda de água, capacidade de retenção de água. Para isso, 500 mg de cada grupo serão pesados e mergulhados em 100 mL de solução tampão PBS (pH 7,4) durante 24 h, em temperatura de 37 °C e sem agitação. Os valores de intumescimento máximo serão calculados utilizando a Eq. 1. Os testes serão realizados em triplicata.

$$I (\%) = \frac{(M_i - M_f)}{(M_f)} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo:

M_i: Massa da amostra seca (mg)

M_f: Massa da amostra intumescida no equilíbrio (mg)

Os grupos com maior capacidade de intumescimento serão utilizados nos testes subsequentes. O efeito do pH do meio de intumescimento na capacidade de

absorção dos hidrogéis compósitos será investigado por meio da imersão de amostras pesando 500 mg em 100 mL de solução tampão durante 24 h a temperatura de 37 °C sem agitação magnética. Serão testadas soluções tampão com diferentes pHs (2, 5 e 12). Os valores referentes à capacidade de intumescimento em diferentes pH serão calculados utilizando a mesma equação. Os testes serão realizados em triplicata.

Para o teste de taxa de perda de água, em 100 mL de solução tampão PBS (pH 7,4) serão imersos 500 mg de cada grupo durante 24 h a 37 °C, sem agitação. Posteriormente, as amostras serão recolhidas e secas numa estufa a 37 °C. Em intervalos de tempo pré-determinados, as amostras serão removidas da estufa e pesadas a fim de se avaliar a cinética de perda de água. O processo de pesagem será realizado até as amostras apresentarem peso constante. A perda de água em cada intervalo de tempo será calculada utilizando a seguinte equação (Eq. 2):

$$I (\%) = \frac{(M_s - M_i)}{(M_i)} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo:

Ms: Massa da amostra seca (mg)

Mi: Massa da amostra intumescida em diferentes intervalos de tempo (mg)

A capacidade de retenção de água das amostras será avaliada utilizando centrifugação. Inicialmente as amostras serão imersas em solução tampão PBS (pH 7,4) durante 24h para que atinjam o intumescimento de equilíbrio. Posteriormente, estas serão pesadas e centrifugadas em uma centrífuga de *eppendorfs*, a 10.000 rpm por 5min a temperatura ambiente. As amostras serão novamente pesadas, e para obter o valor de retenção de água será utilizada a seguinte equação (Eq. 3):

$$\text{Capacidade} = \frac{M_c}{M_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo:

Mc: Massa da amostra após ser centrifugada (mg)

Mi: Massa da amostra intumescida no equilíbrio (mg)

2.2.6.5 Taxa de liberação de Ca e Sr

A taxa de liberação de cálcio e estrôncio será estabelecida utilizando um espectrômetro de emissão ótico com acoplamento de plasma indutivo, onde as amostras serão colocadas em solução tampão PBS. Diariamente, o PBS será coletado e a quantidade de íons liberados será quantificada utilizando um espectrômetro até completar 30 dias de análise.

2.2.7 Avaliação do comportamento celular e a capacidade indutora

Para avaliar o comportamento celular sobre os Hidrogéis experimentais, será analisado a citotoxicidade e a diferenciação óssea de células-tronco. Para esse estudo uma linhagem primária de células-tronco de polpa dental humana (DPSC) utilizada. 3 Corpos de prova de 5mm de diâmetro e 1mm de comprimento serão utilizados para cada grupo em cada um dos experimentos.

2.2.7.1 Cultivo celular

Células-tronco da polpa dental serão cultivados no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Cultilab®) suplementados com soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®) a 10%. Uma garrafa (75 cm³) de cultivo celular contendo as células será transferida para a incubadora controlada com temperatura de 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Quando a subconfluência for atingida (80%) as células serão lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) (GIBCO®), com objetivo de remover os metabólitos. Após isso, serão utilizados 5mL de tripsina/EDTA (GIBCO®) por 5 min para que ocorra a desagregação celular. Para inativação da tripsina, será utilizada a mesma quantidade de uma solução de DMEM + SFB 10%. A suspensão com as células será depositada em tubos cônicos de 15 mL e centrifugada por 5 min, sob a rotação de 1000 rpm resultando em uma força G de 180. Desta forma, a precipitação das células no fundo do tubo será realizada. O Sobrenadante será removido, restando apenas o *pellet* celular. As células serão resuspendidas em 3 mL de DMEM + SFB 10 % e 20 µL serão removidos para contagem celular em câmara de Neubauer.

2.2.7.2 Citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade o protocolo de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) será realizado em 24 horas de cultivo. Brevemente, as células-tronco serão cultivadas em uma placa de 96 poços (n=10 por grupo) sendo suplementadas com DMEM + SFB 10 % (200 µL). A placa será incubada em condições controladas (37 °C e 5 % de CO₂) por 24 h para que ocorra a adesão celular. Hidrogéis serão confeccionados na dimensão de 5 mm x 1 mm e esterilizados por 1 h em radiação ultravioleta. Após isso, serão imersos em *eppendorfs* contendo 1 mL de DMEM/SFB 10 % e mantidos por 24 h a temperatura de 37 °C para realização dos eludatos. Assim, 200µL dos eludatos serão depositados sobre as células e mantidos por 3 e 5 dias. Após o período, 0,5mg de MTT será diluído em PBS, onde serão depositas 200 µL da solução em cada poço. A placa será mantida por mais 4hs em condições controladas. Após o período, o meio será aspirado e os cristais de formazan resuspendidos em 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) 10%. O DMSO permanecerá em contato com as células por 15 min e em seguida a placa será colocada por mais 5 min em um agitador (150 rpm). Os resultados serão avaliados por meio de espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA, em um comprimento de onda de 540 nm, onde serão considerados os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular.

2.2.7.3 Adesão celular

Para avaliar a adesão celular serão utilizados marcadores indicadores de vinculina, e observados por imunohistoquímica. Após três dias de contato das células com os hidrogéis, os grupos serão depositados em formol para que ocorra a fixação. Os espécimes serão estendidos em lâminas de vidro onde os cortes inicialmente serão desparafinizados e reidratados e submetidos à imunohistoquímica utilizando marcadores para vinculina. A análise descritiva do padrão de marcação imunohistoquímica, identificação e a distribuição dos antígenos será realizada através da microscopia óptica. Os achados serão anotados individualmente e estabelecido o padrão de marcação para o antígeno pesquisado, bem como a sua localização.

2.2.7.4 Indução óssea

Para avaliar a diferenciação óssea, as células serão cultivadas utilizando o meio convencional e por duplicata utilizando o meio com o kit comercial para diferenciação óssea em 10% (v/v). Nos dias 7, 14, 21 e 28, será avaliada a expressão de fosfatase alcalina (FA) utilizando imunohistoquímica.

2.2.8 Avaliação *in vivo* do Hidrogel Compósito

Para avaliar o comportamento *in vivo* do hidrogel compósito, os compósitos de melhor comportamento com Hidroxiapatita, e Hidroxiapatita de estrôncio serão avaliados. O estudo será realizado em 50 ratos divididos em 5 grupos. Na intervenção, os animais serão anestesiados com 0,008 mL/100 g de ketamina e 0,004 mL/100 g de cloridrato de xilazina ao 2%.

Uma incisão semilunar de espessura total será realizada com uma lâmina de bisturi na região anterior da calota craniana com direção anteroposterior. Um defeito ósseo crítico de 5mm de diâmetro será realizado com uma trefina em baixa rotação sob irrigação contínua. Seguindo o grupo correspondente, o material será colocado na cavidade e a ferida será suturada. Depois dos procedimentos, os animais serão colocados em caixas individuais até a sua recuperação injetando 50 mg/kg de analgésico opióide.

Tabela 2 – Grupos dos defeitos ósseos em ratos

Material 1	Controle negativo, sem tratamento
Material 2	Controle positivo, hidrogel convencional
Material 3	Experimental, Hidrogel compósito com Hidroxiapatita
Material 4	Experimental, Hidrogel compósito com Hidroxiapatita de estrôncio
Material 5	Controle comercial (Bioss Collagen ®)

Os animais serão sacrificados depois de 14 ou 21 dias do ensaio, anestesiados com hidrato de cloral (350 mg/kg) e solução salina seguido de p-formaldeído 10% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) injetado transcardialmente. A área tratada com os tecidos circundantes será removida em bloco. Cada fragmento será guardado em formalina neutra tamponada por 48 h. Os fragmentos serão descalcificados com ácido nítrico 10% sob agitação por 3-4 semanas a temperatura

ambiente. As amostras serão fixadas em blocos de parafina e processadas para realização de análise histomorfométrica. Além disso, será quantificada a quantidade de tecido ósseo formado através do auxílio de um software (Image J®).

2.2.9 Análise dos dados

Os resultados obtidos serão analisados qualitativa e quantitativamente. Dados qualitativos serão apresentados descritivamente enquanto dados quantitativos serão checados quanto à normalidade de sua distribuição, para a escolha do teste estatístico apropriado. Diferenças estatísticas serão consideradas quando p for ≤ 0.05 . Os dados serão analisados pelo software SigmaStat® v3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA).

2.3 Cronograma

1. Atualização bibliográfica, capacitação de laboratório
2. Compra de reagentes
3. Síntese das partículas
4. Caracterização das partículas
5. Preparo dos hidrogéis
6. Caracterização dos hidrogéis
7. Estudo *in vivo*
8. Análise de dados
9. Redação do artigo
10. Defesa da tese

Atividade	Ano: 2017		Ano: 2018		Ano: 2019	
	Semestre		Semestre		Semestre	
	1	2	1	2	1	2
1	X	X	X			
2	X	X	X	X		
3		X	X			
4		X	X	X		
5			X	X		
6			X	X		
7				X	X	
8					X	X
9					X	X
10						X

2.4 Orçamento

Reagentes para a síntese	Valores (R\$)
Poli(álcool vinílico) 500G	R\$ 739,00
Sulfato de condroitina 10G	R\$ 806,00
Dihidrogeno fosfato de amônio 100G	R\$ 1.324,00
Nitrato de Cálcio Tetrahidratado 500G	R\$ 330,00
Nitrato de Estrôncio 100G	R\$ 231,00
Hialuronidase 50mg	R\$ 600,00
Controle Celular	
PBS 10L	R\$ 215,00
Meio DMEM 5L	R\$ 150,00
Soro Fetal Bovino 1L	R\$ 200,00
Tripsina/EDTA 100ml	R\$ 45,00
Inmunohistoquímica	
Indicador de Vinculina 100UL	R\$ 1.000,00
Marcador Secundário + DAB	R\$ 500,00
MTT 100MG	R\$ 88,00
Indicador Fosfatase alcalina 0,25ML	R\$ 240,00
Controle In Vivo	
60 ratos wistar	R\$ 500,00

Dieta de ratos	R\$ 600,00
Albergue dos animais	R\$ 600,00
Bioss Collagen	R\$ 5.000,00
TOTAL	R\$ 13.168,00

2.5 Referências

ALCAIDE, M. et al. Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. **Biomaterials**, 2009.

ANDERSEN, O. Z. et al. Accelerated bone ingrowth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants. **Biomaterials**, 2013.

ANISHA, B. S. et al. Chitosan-hyaluronan/nano chondroitin sulfate ternary composite sponges for medical use. **Carbohydrate Polymers**, 2013.

ARAÚJO, M. G.; LILJENBERG, B.; LINDHE, J. Dynamics of Bio-Oss®Collagen incorporation in fresh extraction wounds: An experimental study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, 2010.

BENIC, G. I.; HÄMMERLE, C. H. F. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. **Periodontology 2000**, 2014.

BODA, S. K. et al. Competing Roles of Substrate Composition, Microstructure, and Sustained Strontium Release in Directing Osteogenic Differentiation of hMSCsACS **Applied Materials and Interfaces**, 2017.

BONNELYE, E. et al. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, 2008.

BRAUX, J. et al. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation. **Acta Biomaterialia**, 2011.

DA SILVA, G. T. et al. Development, characterization and biocompatibility of chondroitin sulfate/poly(vinyl alcohol)/bovine bone powder porous biocomposite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 72, p. 526–535, mar. 2017.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. **Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications** **Biomaterials**, 2003.

FONSECA, J. E.; BRANDI, M. L. Mechanism of action of strontium ranelate: What are the facts? **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, 2010.

GENTLEMAN, E. et al. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on

osteoblasts and osteoclasts in vitro. **Biomaterials**, 2010.

ISAAC, J. et al. Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells. **European cells & materials**, v. 21, p. 130–43, 2011.

IVIGLIA, G. et al. Novel bioceramic-reinforced hydrogel for alveolar bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, 2016.

MATSUNO, T. et al. Alveolar bone tissue engineering using composite scaffolds for drug delivery **Japanese Dental Science Review**, 2010.

NAGATA, M. et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: An immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone**, v. 45, n. 2, p. 339–345, 1 ago. 2009.

NARDONE, V. et al. In Vitro Effects of Strontium on Proliferation and Osteoinduction of Human Preadipocytes. **Stem Cells International**, 2015.

NYMAN, S. et al. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **Journal of Clinical Periodontology**, 1982.

PARK, J. W.; KANG, D. G.; HANAWA, T. New bone formation induced by surface strontium-modified ceramic bone graft substitute. **Oral Diseases**, 2016.

PLACE, E. S. et al. Strontium- and Zinc-Alginate Hydrogels for Bone Tissue Engineering. **Tissue Engineering Part A**, 2011.

SAIDAK, Z.; MARIE, P. J. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. **Pharmacology and Therapeutics**, 2012.

SARKAR, S. K.; LEE, B. T. Hard tissue regeneration using bone substitutes: An update on innovations in materials. **Korean Journal of Internal Medicine**, 2015.

SHAPIRO, J. M.; OYEN, M. L. Hydrogel Composite Materials for Tissue Engineering Scaffolds. **JOM**, v. 65, n. 4, p. 505–516, 1 abr. 2013.

SHAPIRO, J. M.; OYEN, M. L. Engineering Approaches for Understanding Osteogenesis: Hydrogels as Synthetic Bone Microenvironments. **Hormone and Metabolic Research**, 2016.

ZHANG, L. et al. Porous hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics promote ectopic osteoblast differentiation from mesenchymal stem cells. **Science and Technology of Advanced Materials**, 2009.

3 Relatório do trabalho de campo

Tendo em vista as metodologias propostas no projeto de pesquisa, algumas modificações foram necessárias em função de ambos, as sugestões da banca e limitações que surgiram no decorrer da pesquisa.

É importante destacar que o estudante responsável por este projeto está no regime diferenciado; assim, houve uma grande limitação durante o planejamento e execução dos testes propostos. Foi necessário combinar a sua presença e a colaboração de outros pesquisadores para que pudéssemos chegar aos resultados finais deste estudo.

Uma vez executado o estudo piloto para estabelecer a quantidades de partículas a serem adicionadas aos hidrogéis, 7 grupos foram criados para executar a sua caracterização: Hidrogel Controle, Hidrogel + HA (5, 10 e 15% em massa), Hidrogel + HASr (5, 10 e 15% em massa)

Na caracterização das partículas de hidrogéis compósitos foi adicionada a metodologia de Espectroscopia Infravermelha por transformada de Fourier (FTIR). A natureza química das partículas e dos hidrogéis sintetizados foi avaliada por FTIR (IR-Affinity-1; Shimadzu, Tokio, Japão) acoplado a um dispositivo de refletância total atenuado. Espécimes em forma de disco foram formados usando KBr e analisados em um comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

Inicialmente, o teste de liberação de íons Ca^{+} e Sr^{+} foi proposto; porém, devido ao fato da impossibilidade de aquisição do eletrodo específico para íons Sr^{+} , essa metodologia não foi executada. Atualmente um equipamento com a capacidade de medir os íons Sr^{2+} e Ca^{2+} está disponível na UFPel, este teste será executado no futuro.

O teste proposto para medir a capacidade de absorção e retenção de líquidos foi executado; porém, somente os dados sobre a absorção de líquidos foram utilizados nesta tese devido ao fato de que os dados de retenção de líquidos não foram de interesse para a futura aplicação clínica deste biomaterial.

Outras modificações realizadas foram referentes aos testes de adesão celular e diferenciação *in vitro*, os quais não foram executados por dificuldades relacionadas a perda da linhagem celular de DPSC; assim, foi possível apenas executar o teste de citotoxicidade. Os testes de adesão celular e de diferenciação *in vitro* com expressão da fosfatase alcalina serão executado no futuro.

Finalmente a proposta de um estudo avaliando o comportamento *in vivo* dos hidrogéis compósitos havia sido feita no projeto de pesquisa. No entanto, devido às demoras para obtenção dos hidrogéis desejados e a aprovação do comitê de ética animal, não foi possível executar esta parte no estudo nos prazos de tempo estabelecidos. Atualmente, o projeto de pesquisa está aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEA 8303-2019) e a metodologia para este teste está sendo montada para sua execução.

No futuro, é esperado que os resultados de todas estas metodologias ainda não executadas possam dar continuidade à linha de pesquisa originando um segundo artigo científico, mostrando uma aplicação mais específica do biomaterial sintetizado.

4 Artigo

Synthesis and characterization of a novel composite hydrogel with strontium-doped hydroxyapatite¹

Guillermo Grazioli^{1,2}, Adriana F. Silva², Jaqueline F. Souza³, Carla David², Lisiane Diehl⁴, Manoel D. Sousa-Neto⁵, Sergio S. Cava⁴, André R. Fajardo³, Rafael R. Moraes²

¹Department of Dental Materials, University of the Republic, Uruguay.

²Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Brazil.

³Laboratory of Technology and Development of Composites and Polymeric Materials – LaCoPol, Federal University of Pelotas, Brazil.

⁴Advanced Crystal Growth and Photonics – CCAF, Federal University of Pelotas, Brazil.

⁵Department of Restorative Dentistry, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Corresponding author:

Prof. Rafael Moraes

Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas

Rua Gonçalves Chaves 457 room 505, 96015-560, Pelotas, RS, Brazil

Tel/Fax: +55 53 32602831 (rafael.moraes@ufpel.edu.br)

ORCID: 0000-0003-1358-5928

¹ Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Dental Materials*.

Abstract

Objectives: The aim of this work was to prepare a biomaterial potentially applicable for bone regeneration based on a hydrogel matrix modified with Hydroxyapatite (HA) and Strontium Hydroxyapatite (HASr) particles.

Methods: For the particle's synthesis, the wet precipitation and calcination method was used. In the case of strontium hydroxyapatite, 50 mol% of calcium was replaced by strontium nitrate in the precipitation phase. The particles were characterized by scanning electron microscopy and X-ray dispersive energy spectroscopy (SEM-EDX – morphology and chemical composition), X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The hydrogels were prepared from mixtures of poly(vinyl alcohol) polymers (PVA) and chondroitin sulfate (CS) using the freeze/thaw technique. During this process, different amounts of HA or HASr (0, 5, 10 or 15% in mass) were added to the hydrogel formulation. The obtained hydrogels (with and without particles) were characterized by FTIR, MEV-EDX and computed microtomography (micro-CT - porosity of the hydrogel). In addition, in vitro tests were performed with these hydrogels in order to evaluate their mechanical properties, liquid absorption capacity and cytotoxicity.

Results: MEV-EDX confirmed a homogeneous distribution of Ca and Sr along the particle structures. The XRD analyzes showed diffraction patterns corresponding to HA and HASr. The FTIR analysis of the hydrogels showed the formation of the polymeric network of the PVA/CS hydrogel, resulting from the physical crosslinking of the PVA chains during the freezing/thawing steps. In addition, FTIR analyzes confirmed the presence of particles (HA or HASr) in hydrogel matrices. The porosity and homogeneous distribution of the particles was confirmed by MEV-EDX showing the presence of Ca^{2+} and Sr^{2+} ions in hydrogels regardless of concentration. The

micro-CT exhibited a total porosity of 30% in the control hydrogel (without particles) and a tendency to reduce total porosity as the proportion of HA or HASr increased. The compressive strength of the composite hydrogel increased with the addition of particles. The cell viability test revealed that all prepared hydrogels are non-toxic and still increase the number of cells in all groups, including the control hydrogel (without particles).

Significance: In conclusion, a modified hydrogel with up to 15% in mass of HA or HASr particles has been successfully synthesized with improved physicochemical properties compared to the control hydrogel, also showing promising manipulative characteristics. The next steps should include alkaline phosphatase assays to observe the ability of hydrogels to induce bone differentiation and *in vivo* tests for bone regeneration on critical size defects in an animal model, in an attempt to assess their future clinical application.

Keywords: bone substitutes; hydrogel; strontium; hydroxyapatite; cell viability.

1. Introduction

Rapid neobone formation is of utmost importance in biomedical science and a challenge for current biomaterials to provide similar esthetic and function of the lost tissue. In dentistry, bone loss may occur in tooth extractions, oncological rejections, fractures, and traumas [1]. Dental implant placement is one of the most frequent situations where bone volume augmentation is needed [2,3]. The current gold standard technique for bone regeneration is the use of autologous graft, which may create morbidity for the donor and has a limitation in the bone volume that can be donated [4]. Commercial products such as biological (heterologous) and synthetic

(allogenic) grafts are alternatives, providing quality control and unlimited quantity, but high economic costs [5,6]. Alternatively, hydrogels – 3D networks formed by cross-linkable polymers able to absorb and retain significant amounts of aqueous liquids [7,8] – have been reported as promising tissue engineering scaffolds alternatives [4,9]. Hydrogels may be porous enough to allow cell migration and nutrient delivery. Also, their hydrophilic nature may aid in absorbing physiological fluids [7,10]. The physical/chemical properties of hydrogels can be tuned by modifying their composition, synthetic method, or addition of bioactive doped particles [7,11].

Under the past few years, hydrogels applicable in tissue engineering have been prepared from different synthetic and/or natural polymers [10,12–15]. Poly vinyl alcohol (PVA) is a water-soluble synthetic polymer widely studied as a tissue engineering scaffold due to its non-toxicity, biocompatibility and biodegradability. PVA-based hydrogels usually show adequate mechanical properties and chemical stability, which allow different biomedical applications such as cartilage implants, drug delivery matrices and temporary skin covers [16–18]. Bioactive compounds can be embedded in PVA hydrogels in order provide biological activity [16,19,20]. Among these compounds, chondroitin sulfate (CS), a sulfated glycosaminoglycan has gained widespread attention in tissue engineering applications. CS is found in the extracellular matrix of cartilage and bone and has been shown to induce pain relief in arthrosis, osteoblast moderation during the mineralization process and regulate stem cell differentiation into bone lineage [9,21–23].

Beyond natural polymers, minerals such as silicates, calcium phosphate, and hydroxyapatite (HA) have also been embedded into PVA-based hydrogel matrices to enhance their biological activity [10,19,24]. HA is the main mineral component of natural bone matrix, showing an excellent osteoconductivity, affinity for adhesive

proteins, and induces osteoblast differentiation by biomineralization of the surfaces [25–27]. In parallel, recent studies have addressed the critical role of strontium (Sr) on bone metabolism [28–31]. Firstly suggested as an adjunct in osteoporosis treatment, later it was observed that Sr might stimulate neobone formation and suppress bone resorption. In contrast, the specific therapeutic pathway of Sr remains poorly understood [31–33]. Some authors raised that chemical and biological behaviors of Sr and calcium (Ca) are similar because of their atomic compatibility, similar electrical charge and ionic radius, reconditioning impaired bone metabolism, stimulating new bone formation and inhibiting bone resorption [34–36]. Other studies indicated that Sr-doped hydroxyapatite (HASr), where Sr substitutes Ca atoms, has a vast and unexplored potential for tissue engineering applications [28,37].

Taking into account these aspects, composite hydrogels combining PVA, CS, and HA/HASr could be suitable biomaterials for bone regeneration. It could be hypothesized that such composite hydrogels could present good plasticity and manipulative characteristics owing to the polymeric content, and bioactive characteristics due to the presence of doped particles. Thus, the objective of this study was to synthesize and characterize novel composite hydrogels embedded with HA particles doped or not with Sr for future bone regeneration applications. To the best of our knowledge, this is the first study to report the preparation and characterization of such composite material. The main hypothesis investigated here is that the addition of HASr to PVA/CS hydrogel matrix would improve its compressive strength without compromising cell toxicity.

2. Materials and methods

The following high purity materials were purchased from Sigma-Aldrich: ammonium dihydrogenphosphate (Cat. 204005, 99.999 %), calcium nitrate (Cat. C1396, ≥ 99.0 %), strontium nitrate (Cat. 243426, ≥ 99.0 %), poly(vinyl alcohol) (Cat. 563900, 99.0 %), chondroitin 4-sulfate (Cat. 27042, ≥ 90.0 %).

2.1. Particle synthesis: hydroxyapatite (HA) and strontium-doped hydroxyapatite (HASr)

A wet-precipitation method was used in the synthesis, as described elsewhere [28]. Briefly, calcium nitrate was gently added to an ammonium dihydrogen orthophosphate solution, which kept under continuous stirring at 80°C. The calcium/phosphate ion ratio was 1:1.67 and the pH was adjusted to 7 by adding NaOH. Next, the solution was centrifuged and the precipitate was collected and thoroughly washed with deionized water. The as-purified precipitate was oven-dried at 60°C overnight and sieved to obtain particles of 125 μm . Finally, the obtained particles were calcined at 1175 °C for 2 h, left to cool and then stored in a desiccator. For HASr, the procedure was basically the same; however, 50 mol% calcium nitrates were replaced by strontium nitrate. In this case, the calcium/strontium/phosphate ion ratio was 0.5:0.5:1.67. Again, after the synthesis, the obtained particles were sieved to 125 μm and calcinated at 1175 °C for 2. The as-synthesized HASr also was stored in a desiccator until its analysis/use.

2.2. Particle characterization: SEM, EDX, XRD, and FTIR analysis

Morphology of HA and HASr particles were observed by using a scanning electron microscopy – SEM (JSM 6610LV; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) equipped with

an energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) microprobe to evaluate chemical composition. Before image acquisition, the particles were coated with gold with a sputter coater. X-ray diffraction (XRD) analysis was performed (D500; Siemens, Munich, Germany) with a Cu-K α radiation source ($\lambda=1.54$ Å) at 40 kV and 1.75 mA. Scanning angle (2θ) ranged from 20 to 50° at 0.02° resolution and 2°/min speed. The chemical nature of HA and HASr was evaluated by Fourier-transform infrared spectroscopy – FTIR (IR-Affinity-1; Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled to an attenuated total reflectance device and analyzed in wavelengths from 400 to 4000 cm⁻¹, with 64 scans and 4 cm⁻¹ resolution.

2.3. Synthesis of hydrogel and composite hydrogels

Physically cross-linked hydrogels were synthesized by applying a freeze/thawing method [38]. First, a PVA-solution was prepared by solubilizing the polymer in distilled water at 10 % m/v ratio under continuous stirring at 75 °C for 1 h. Separately, CS was solubilized in distilled water at 10 % m/v ratio under continuous stirring at room temperature, for 1 h. The two solutions were then mixed and homogenized under magnetic stirring for 1 h at room temperature. PVA/CS mass ratio was fixed at 1:1. Next, the PVA/CS solution was frozen at -20 °C overnight and thawed at room temperature for 8 h. This freeze/thaw process was repeated four times for enabling polymer cross-linking and resulting in a 3D network. Finally, the physically cross-linked PVA/CS hydrogels (without HA or HASr) were recovered, thoroughly washed in distilled water and dried for 48 h at 45°C in a vacuum oven.

At the same time, composite hydrogels were synthesized using a similar protocol with minor modifications. Briefly, after the mixing of the PVA and CS solutions different amounts of HA or HASr particles (5 %, 10 %, or 15 % m/m) were

added. The resulting systems were homogenized under vigorous magnetic stirring for 1 h. The percentage of particles in the composite hydrogels was defined in pilot tests, which indicated precipitation of particles when an amount of 20 % in mass (or superior) is added. The freeze/thaw process of composite hydrogels was the same for the pure hydrogel. Table 1 summarizes the codification of each hydrogel sample prepared and detail their composition.

2.4. Characterization of pure and composite hydrogels

The chemical nature of the hydrogel samples was assessed by FTIR analysis similarly to described in Section 2.2. Thermogravimetric analysis was performed between 30 and 700°C under a N₂ flow at 100 mL/min and 10°C/min heating rate (SDT Q600; TA Instruments, New Castle, DE, USA). In this case, specimens between 0.1 and 1 mg previously weighted were put into the hermetic platinum sample holders. Topography and particle dispersion were evaluated by SEM/EDX. Before image acquisition, the specimens were swelled in distilled water overnight, then frozen in liquid N₂, carefully fractured, and dried under vacuum. The fractured sections were gold-coated before SEM visualization. Mean pore size of the pure hydrogel, HASr10 and HA10 composites were estimated by measuring 30 random pores selected from their SEM images with ImageJ® software (NIH, Bethesda, MD, USA). Porosity was also evaluated by X-ray microtomography – microCT (model 1174; SkyScan, Kontich, Belgium) using 50 kVp, 800 mA, a 19.65 µm isotropic resolution and 360° rotation. For compressive strength test and elastic modulus, five cubic specimens (1 mm³) were swelled up to equilibrium before the test and evaluated by a texture analyzer (TA.XTplusC; Stable Micro Systems, London, UK) with 50% maximum strain, 0.5 mm/s test speed, and 50 N load cell. The liquid uptake

capacity (swelling capacity) of the hydrogels was measured by a conventional gravimetric procedure. Briefly, pre-weighed 500 mg of each dried hydrogel were left in contact with phosphate-buffered saline (PBS, pH = 7.4) under low stirring and weighted periodically until swelling equilibrium. The following equation was employed to calculate the swelling degree at different times:

$$\text{Swelling (\%)} = \frac{(w_s - w_d)}{w_d} \times 100,$$

where w_d is the initial dry weight and w_s is the swollen weight. Three specimens were tested for each hydrogel.

2.5. Cytotoxicity assays

The research protocol was approved by the institutional Research Ethics Committee (protocol 2.078.368). In vitro cytotoxic assay was performed by MTT method. Multipotent dental pulp stem cells (DPSC) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Three disk-shaped specimens (5 mm diameter, 1 mm thickness) of each hydrogel were placed in contact with the culture media at 37°C for 24 h. Simultaneously, DPSC were seeded in a 96 well plate at 30×10^4 cells per well and left to adhere for 24 h at 37 °C, with 5 % CO₂. The culture media were then substituted by the eluates obtained from the specimens in contact with the culture media and put in contact with the cell culture for another 24 h. Finally, the media were substituted by a PBS/MTT solution at 5 mg/mL and left in contact for 4 h. Formazan precipitates were solubilized by adding dimethyl sulfoxide and measured with a microplate reader at 570 nm.

2.6. Data analysis

Data from the physical/chemical analysis were analyzed qualitatively, whereas compressive strength, elastic modulus, and cytotoxicity data statistically analyzed by One-Way Analysis of Variance followed by the Tukey *post hoc* test, using SigmaStat® software v3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) at $\alpha=0.05$ significance level.

3. Results and discussion

Novel composite materials are emerging every day seeking to provide the ideal composition and characteristics such as mechanical properties, bioactivity, biodegradation, and plasticity for clinical use [25]. The synthesis of a novel biomaterial based in a PVA/CS hydrogel embedded with HA or HASr particles was successful and showed promising behavior for tissue engineering applications.

3.1. Characterization of HA and HASr particles

Figure 1 presents SEM images of the synthesized HA and HASr particles and EDX elemental mappings for Ca, P, and Sr. As noticed from the images, both particles (HA and HASr) were irregular in shape, microporous, and appeared to have narrow size variation. Porosity is probably a result of solvent evaporation and nitrates removal during synthesis. HA particles were predominantly composed by individual crystals whereas, by comparison, HASr particles were larger and showed more crystal agglomeration. Previous studies have shown the growth in length and width of similar particles when Ca^{2+} is half substituted by Sr^{2+} [39,40], explaining this difference in particles morphology and size. Ca and P were regularly distributed in both particles as well as Sr was in HASr particles.

The XRD patterns (Figure 2) obtained for HA diffraction showed peaks associated with hydroxyapatite (JCPDS 09-0432, peaks at $2\theta = 29^\circ, 31^\circ, 32^\circ, 35^\circ, 47^\circ, 49^\circ$ and 50°) and calcium carbonate (JCPDS 47-1743, peaks at $2\theta = 30^\circ$ and 36°). Conversely, the HASr pattern showed peaks associated with strontium hydroxyapatite (JCPDS 33-1348, peaks at $2\theta = 23^\circ, 25^\circ, 27^\circ, 32^\circ$ and 42°) and strontium carbonate (JCPDS 05-0418, peaks at $2\theta = 26^\circ$ and 33°). In addition, the synthesized powders showed diffraction patterns corresponding to the characteristic peaks of hexagonal HA and HASr crystals [41], compatible with JCPDS files. The presence of carbonated compounds could be due to carbonated remains from raw materials of secondary reactions from the calcination method [28]. FTIR spectra recorded for HA and HASr particles (Figure 3) showed bands ascribed to phosphate groups (PO_4^{3-}) at 1100 cm^{-1} and 564 cm^{-1} and intense bands at 872 cm^{-1} due to the OH ions from P–OH [6]. The band at 1350 cm^{-1} (CO_3) verified the presence of carbonated residues. In corroboration, it has been reported that the FTIR spectra of HA and HASr are mostly similar, showing phosphates and hydroxide bands with minimal signal shifts to lower wavenumbers [42]. These results confirm the synthesis of pure apatite powder phase.

3.2. Characterization of pure and composite hydrogels

The FTIR spectrum (Figure 3) of pure hydrogel showed the characteristic bands proceeding from PVA and CS, and bands due to the physical cross-linking of the PVA chains before the freeze/thaw process [38,43]. The broad band centered at 3280 cm^{-1} is due to the OH stretching (free hydroxyl groups of PVA and CS and H-bonded hydroxyl groups). In addition, bands at 2916 cm^{-1} and 1088 cm^{-1} are associated with the PVA (C–H stretching of alkyl groups and C–O group stretching),

while the bands observed at 1650 cm^{-1} and 1420 cm^{-1} and 1253 cm^{-1} are due to the CS (C=O, C-O and S=O stretching, respectively) [44]. Finally, a small band noticed at 1140 cm^{-1} related to high crystallinity of PVA after the cross-linking process confirms the hydrogel synthesis [45]. The spectra obtained for the composite hydrogels (embedded with different amounts of HA or HASr) were quite similar to the spectrum obtained for pure hydrogel. However, it is noticed and increased intensity in the bands associate with chemical structure of HA and HASR particles (at 1110 cm^{-1} , 872 cm^{-1} , and 564 cm^{-1}). Overall, the intensity of these bands increases as the amount of HA or HASr embedded in the hydrogel matrixes. This result suggests the successful synthesis of the composite hydrogels. Figure 4 presents thermal analyses (TGA and DTG curves) of all synthesized hydrogels. In general lines, all samples showed an initial mass loss stage between 75°C and 150°C due to the evaporation of water highlighting the hydrophilic nature of such materials. The additional mass loss stages observed between 200°C and 550°C are ascribed to the thermal degradation of the polymers used to synthesize the hydrogels. Overall, the thermal degradation of PVA encompasses two stages. The first one (between 210°C and 400°C) is due the elimination of its hydroxyl side groups, while the second (between 400°C and 500°C) is due to the polyene chain degradation [46,47]. On the other hand, the thermal degradation of CS occurs in a unique stage (between 225°C and finishes at 450°C) [48]. At the end of the TGA analysis (700°C) the residual mass of pure hydrogel was less 10 % of its initial mass. As compared to the pure hydrogel, the TGA curves obtained for the composite hydrogels embedded with 15 % of HA or HASr showed some discrepancies. For instance, a new mass loss stage (with maximum temperature at 275°C) was observed, while the maximum temperatures of each mass loss stage of pure hydrogel where shifted. Probably, the adding of HA or HASr

impairs the physical cross-linking of the PVA chains and affects the interaction between PVA and CS. As a result, the thermal behavior of the composites is altered as compared to the pure hydrogel [7]. Furthermore, the residual mass of the composite hydrogels at 700 °C was considerably higher than the residue of pure hydrogel, which can be explained by the inorganic (and thermally stable) structure of HA and HASr. In summary, the TGA/DTG analysis corroborates de FTIR data and confirms the composite formation.

Figure 5 shows the SEM images taken of the pure and composite hydrogels with 10% of HA and HASr. As noticed, both pure and composite hydrogels exhibit high porosity, with irregular porous distributed non-uniformly. The pore sizes in this analysis were not statistically different ($p=0.127$), with the following means $\pm$ standard deviations: pure hydrogel $18.8 \pm 6.7 \mu\text{m}$, HA10 $15.0 \pm 4.9 \mu\text{m}$, and HASr10 $14.8 \pm 3.5 \mu\text{m}$. EDX elemental mappings of Ca and Sr for the composite hydrogels are also shown in Figure 5. This analysis confirmed a regular distribution of HA and HASr particles (presence of Ca or Sr) in the hydrogel matrix. Particle inclusions appeared to render the hydrogels a more irregular surface texture without affecting pore size. MicroCT analysis (Figure 6) revealed the presence of total porosity of 33 % for pure hydrogel and between 21% to 31% when HA or HASr particles were added, particle addition showed a trend to reduce total porosity. This finding suggests that the addition of particles reduces the total porosity of composite hydrogels without reducing pore size. Total porosity and pore size are important factors for implantable biomaterials as they contribute to blood and nutrient absorption, molecular signaling diffusion, and cellular migration [25].

The effect of pore size and total porosity on cellular adhesion, migration and proliferation for tissue regeneration has been discussed in the literature. Whereas

some authors indicate a 100- μm pore size to be acceptable for cell migration, others showed that a pore size below 16 μm might be suitable for nutrient delivery, cell migration and proliferation [1,49,50]. We believe that the novel composite hydrogel presented here showed acceptable pore size for tissue engineering applications. Nevertheless, methods to tune the porosity and pore size are feasible during the synthesis, including freeze-dried method [10] or decreasing polymer concentrations in the solution step of synthesis [7,19]. Changing the polymer concentration could increase the separation between particles in the solution state, increasing porosity after the freeze-thawing process.

The mechanical strength of the hydrogels was improved as the concentration of HA or HASr particles was increased (Figure 7). With the addition of HA and HASr particles the composite hydrogels also became stiffer. Compressive strength and elastic modulus of HA15 and HASr15 were statistically superior to all other groups ($p < 0.05$). The mechanical reinforcement occurs by the presence of particles acting as fillers. The mechanical properties are an essential parameter when analyzing hydrogels for bone regeneration. It has been shown that low mechanical properties could affect cell proliferation and differentiation [1,7]. Also, for clinical application, bone regeneration materials should withstand compressive forces to maintain the shape and volume in the area for regeneration. In corroboration, it has been reported an increase up to 240% in the mechanical properties of PVA hydrogels by addition of HA nanoparticles [1].

Water uptake by a scaffold is crucial for the absorption of physiological fluid and transport of nutrients throughout it [25,51]. When placing the hydrogel in a bone defect, it would lead to absorption of blood and molecular markers and aid in inducing cells to migrate inside it. In the swelling analysis (Figure 8), the presence of

HASr particles led to a faster water uptake but did not interfere with the total water uptake capacity of the composite hydrogels. When HA was added, water uptake capabilities are decreased considerably, which might be related to pore size reduction and interactions between HA and the hydrogel structure.

3.3. Cytotoxicity

Cell viability results are shown in Figure 9. The interaction with cells is crucial for tissue engineering biomaterials. Biocompatibility is important, but bioactivity is even more relevant. Bioactive materials would not only allow cell viability, but also promote cell proliferation. Cellular viability assay showed an increased cellular number above 120% in all groups including the control hydrogel, and no statistical difference between groups ($p=0.434$). The increase in cell number suggests a bioactive effect of the composite hydrogels on the cultured cells. This could be explained as an effect of the constituents of the pure and composite hydrogels tested here. CS has been shown to increase cell proliferation up to 120% [9], whereas Sr was shown to enhance cell replication and cell functional activities, such as bone matrix synthesis and metabolic activity [52].

4. Conclusions

When planning a scaffold for tissue engineering and bone regeneration chemical, physical and biological aspects must be considered, but also clinical aspects must be well-thought-out. In this study, composite hydrogels embedded with up to 15 % (in mass) of HA or HASr particles was successfully synthesized with improved physical-chemical properties as compared with the control (pure) hydrogel,

also showing promising manipulative characteristics. These features were assessed by FTIR, thermal, morphological and mechanical analysis. Moreover, the characterization studies conducted here allow inferring that the synthesized composites exhibited outstanding morphological, mechanical and swelling properties, which are particularly interesting for scaffolding. Furthermore, the absence of toxicity and increased cell number indicates that this novel composite hydrogel containing HA and HASr could have a decisive role as biomedical material. Next steps should include proliferation assays to confirm the hydrogels bioactivity, alkaline phosphatase assays to observe the hydrogels capacity to induce bone differentiation and *in vivo* testing for bone regeneration on critical size defect in an animal model.

Acknowledgements

This study was financed by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brazil (Grant 17/2551-0001070-1) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil (Finance Code 001). The sponsors had no role in study design, collection, analysis or interpretation of data, writing the report, or decision to submit for publication.

References

- [1] Hou R, Zhang G, Du G, Zhan D, Cong Y, Cheng Y, et al. Magnetic nanohydroxyapatite/PVA composite hydrogels for promoted osteoblast adhesion and proliferation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2013;103:318–25.
- [2] Benic GI, Hämmerle CHF. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol 2000* 2014;66:13–40.

- [3] Park J-W, Kang D-G, Hanawa T. New bone formation induced by surface strontium-modified ceramic bone graft substitute. *Oral Dis* 2016;22:53–61.
- [4] Iviglia G, Cassinelli C, Torre E, Baino F, Morra M, Vitale-Brovarone C. Novel bioceramic-reinforced hydrogel for alveolar bone regeneration. *Acta Biomater* 2016;44:97–109.
- [5] Alcaide M, Serrano M-C, Pagani R, Sánchez-Salcedo S, Vallet-Regí M, Portolés M-T. Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. *Biomaterials* 2009;30:45–51.
- [6] Galia CR, Lourenço AL, Rosito R, Macedo CAS, Camargo LMAQ. Caracterização físico-química do enxerto de osso bovino liofilizado. *Rev Bras Ortop* 2011;46:444–51.
- [7] Bi S, Wang P, Hu S, Li S, Pang J, Zhou Z, et al. Construction of physical-crosslink chitosan/PVA double-network hydrogel with surface mineralization for bone repair. *Carbohydr Polym* 2019;224:115176.
- [8] Parameswaran-Thankam A, Al-Anbaky Q, Al-karakooly Z, RanguMagar AB, Chhetri BP, Ali N, et al. Fabrication and characterization of hydroxypropyl guar-poly (vinyl alcohol)-nano hydroxyapatite composite hydrogels for bone tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 2018;29:2083–105.
- [9] Derakhshan ZH, Shaghaghi B, Asl MP, Majidi M, Ghazizadeh L, Chegini A, et al. In situ forming hydrogel based on chondroitin sulfate-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 2015;64:919–26.
- [10] Pang L, Shen Y, Hu H, Zeng X, Huang W, Gao H, et al. Chemically and physically cross-linked polyvinyl alcohol-borosilicate gel hybrid scaffolds for bone regeneration. *Mater Sci Eng C* 2019;105:110076.
- [11] Hou R, Nie L, Du G, Xiong X, Fu J. Natural polysaccharides promote

- chondrocyte adhesion and proliferation on magnetic nanoparticle/PVA composite hydrogels. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015;132:146–54.
- [12] Sarkar SK, Lee BT. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. *Korean J Intern Med* 2015;30:279.
- [13] Anisha BS, Sankar D, Mohandas A, Chennazhi KP, Nair S V., Jayakumar R. Chitosan–hyaluronan/nano chondroitin sulfate ternary composite sponges for medical use. *Carbohydr Polym* 2013;92:1470–6.
- [14] Shapiro J, Oyen M. Engineering Approaches for Understanding Osteogenesis: Hydrogels as Synthetic Bone Microenvironments. *Horm Metab Res* 2016;48:726–36.
- [15] Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003;24:4337–51.
- [16] Song W, Markel DC, Jin X, Shi T, Ren W. Poly(vinyl alcohol)/collagen/hydroxyapatite hydrogel: Properties and in vitro cellular response. *J Biomed Mater Res Part A* 2012;100A:3071–9.
- [17] Ngawhirunpat T, Opanasopit P, Rojanarata T, Akkaramongkolporn P, Ruktanonchai U, Supaphol P. Development of Meloxicam-Loaded Electrospun Polyvinyl Alcohol Mats as a Transdermal Therapeutic Agent. *Pharm Dev Technol* 2009;14:73–82.
- [18] Sailaja GS, Sreenivasan K, Yokogawa Y, Kumary T V., Varma HK. Bioinspired mineralization and cell adhesion on surface functionalized poly(vinyl alcohol) films. *Acta Biomater* 2009.
- [19] Oh SH, An DB, Kim TH, Lee JH. Wide-range stiffness gradient PVA/HA hydrogel to investigate stem cell differentiation behavior. *Acta Biomater* 2016;35:23–31.

- [20] Choi SM, Singh D, Kumar A, Oh TH, Cho YW, Han SS. Porous Three-Dimensional PVA/Gelatin Sponge for Skin Tissue Engineering. *Int J Polym Mater* 2013;62:384–9.
- [21] Dwivedi P, Nayak V, Kowshik M. Role of gold nanoparticles as drug delivery vehicles for chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis. *Biotechnol Prog* 2015.
- [22] Hosaka YZ, Iwai Y, Tamura JI, Uehara M. Diamond squid (*Thysanoteuthis rhombus*)-derived chondroitin sulfate stimulates bone healing within a rat calvarial defect. *Mar Drugs* 2013.
- [23] Henrotin Y, Marty M, Mobasheri A. What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? *Maturitas* 2014.
- [24] Lan W, Zhang X, Xu M, Zhao L, Huang D, Wei X, et al. Carbon nanotube reinforced polyvinyl alcohol/biphasic calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering. *RSC Adv* 2019;9:38998–9010.
- [25] Barros J, Ferraz MP, Azeredo J, Fernandes MH, Gomes PS, Monteiro FJ. Alginate-nanohydroxyapatite hydrogel system: Optimizing the formulation for enhanced bone regeneration. *Mater Sci Eng C* 2019;105:109985.
- [26] Obara S, Yamauchi T, Tsubokawa N. Evaluation of the stimulus response of hydroxyapatite/ calcium alginate composite gels. *Polym J* 2010;42:161–6.
- [27] Turco G, Marsich E, Bellomo F, Semeraro S, Donati I, Brun F, et al. Alginate/hydroxyapatite biocomposite for bone ingrowth: A trabecular structure with high and isotropic connectivity. *Biomacromolecules* 2009;10:1575–83.
- [28] Chandran S, Babu S S, Vs HK, Varma HK, John A. Osteogenic efficacy of strontium hydroxyapatite micro-granules in osteoporotic rat model. *J Biomater*

- Appl 2016;0:1–11.
- [29] Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone* 2008;42:129–38.
 - [30] Zhang W, Zhao F, Huang D, Fu X, Li X, Chen X. Strontium-Substituted Submicrometer Bioactive Glasses Modulate Macrophage Responses for Improved Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:30747–58.
 - [31] Braux J, Velard F, Guillaume C, Bouthors S, Jallot E, Nedelec J-M, et al. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation. *Acta Biomater* 2011;7:2593–603.
 - [32] Boda SK, Thrivikraman G, Panigrahy B, Sarma DD, Basu B. Competing Roles of Substrate Composition, Microstructure, and Sustained Strontium Release in Directing Osteogenic Differentiation of hMSCs. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017;9:19389–408.
 - [33] Fonseca JE, Brandi ML. Mechanism of action of strontium ranelate: what are the facts? *Clin Cases Miner Bone Metab* 2010;7:17–8.
 - [34] Huang TH, Kao CT, Shen YF, Lin YT, Liu YT, Yen SY, et al. Substitutions of strontium in bioactive calcium silicate bone cements stimulate osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med* 2019;30.
 - [35] Zhu H, Zhai D, Lin C, Zhang Y, Huan Z, Chang J, et al. 3D plotting of highly uniform $\text{Sr}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ bioceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Chem B* 2016;4:6200–12.
 - [36] John Ł, Podgórska M, Nedelec J-M, Cwynar-Zajac Ł, Dzięgiel P. Strontium-doped organic-inorganic hybrids towards three-dimensional scaffolds for

- osteogenic cells. *Mater Sci Eng C* 2016;68:117–27.
- [37] Chandran S, Shenoy SJ, Babu S. S, P. Nair R, H.K. V, John A. Strontium Hydroxyapatite scaffolds engineered with stem cells aid osteointegration and osteogenesis in osteoporotic sheep model. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2018;163:346–54.
- [38] da Silva GT, Voss GT, Kaplum V, Nakamura C V., Wilhelm EA, Luchese C, et al. Development, characterization and biocompatibility of chondroitin sulfate/poly(vinyl alcohol)/bovine bone powder porous biocomposite. *Mater Sci Eng C* 2017;72:526–35.
- [39] Lin Y, Yang Z, Cheng J, Wang L. Synthesis, characterization and antibacterial property of strontium half and totally substituted hydroxyapatite nanoparticles. *J Wuhan Univ Technol Sci Ed* 2008;23:475–9.
- [40] Bigi A, Boanini E, Capuccini C, Gazzano M. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Inorganica Chim Acta* 2007;360:1009–16.
- [41] Ravi ND, Balu R, Sampath Kumar TS. Strontium-Substituted Calcium Deficient Hydroxyapatite Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Antibacterial Properties. *J Am Ceram Soc* 2012;95:2700–8.
- [42] Frasnelli M, Cristofaro F, Sglavo VM, Dirè S, Callone E, Ceccato R, et al. Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. *Mater Sci Eng C* 2017;71:653–62.
- [43] Quadrado RFN, Gohlke G, Oliboni RS, Smaniotto A, Fajardo AR. Hybrid hydrogels containing one-step biosynthesized silver nanoparticles: Preparation, characterization and catalytic application. *J Ind Eng Chem* 2019;79:326–37.
- [44] Shahzad S, Yar M, Siddiqi SA, Mahmood N, Rauf A, Qureshi Z-A, et al. Chitosan-based electrospun nanofibrous mats, hydrogels and cast films: novel

- anti-bacterial wound dressing matrices. *J Mater Sci Mater Med* 2015;26:136.
- [45] Reis EF dos, Campos FS, Lage AP, Leite RC, Heneine LG, Vasconcelos WL, et al. Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein adsorption. *Mater Res* 2006;9:185–91.
- [46] Peng Z, Kong LX. A thermal degradation mechanism of polyvinyl alcohol/silica nanocomposites. *Polym Degrad Stab* 2007;92:1061–71.
- [47] Kim TH, An DB, Oh SH, Kang MK, Song HH, Lee JH. Creating stiffness gradient polyvinyl alcohol hydrogel using a simple gradual freezing–thawing method to investigate stem cell differentiation behaviors. *Biomaterials* 2015;40:51–60.
- [48] Jardim KV, Joanitti GA, Azevedo RB, Parize AL. Physico-chemical characterization and cytotoxicity evaluation of curcumin loaded in chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles. *Mater Sci Eng C* 2015;56:294–304.
- [49] Woodard JR, Hildore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JAC, et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* 2007;28:45–54.
- [50] Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret J-P, Chavassieux P, et al. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:1089–97.
- [51] Venkatesan J, Pallela R, Bhatnagar I, Kim SK. Chitosan-amylopectin/hydroxyapatite and chitosan-chondroitin sulphate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2012;51:1033–42.
- [52] Bizelli-Silveira C, Abildtrup LA, Spin-Neto R, Foss M, Søballe K, Kraft DCE. Strontium enhances proliferation and osteogenic behavior of bone marrow

stromal cells of mesenchymal and ectomesenchymal origins in vitro. Clin Exp Dent Res 2019;5:541–50.

Table 1. Pure and composite hydrogels synthesized by a freeze/thaw cycling method
(% in mass)

Code	Composition
Pure	PVA/CS hydrogel
HASr5	PVA/CS hydrogel + 5 % HASr
HASr10	PVA/CS hydrogel + 10 % HASr
HASr15	PVA/CS hydrogel + 15 % HASr
HA5	PVA/CS hydrogel + 5 % HA
HA10	PVA/CS hydrogel + 10 % HA
HA15	PVA/CS hydrogel + 15 % HA

PVA: poly vinyl alcohol, CS: chondroitin sulfate, HA: hydroxyapatite particles, HASr: strontium-doped hydroxyapatite particles.

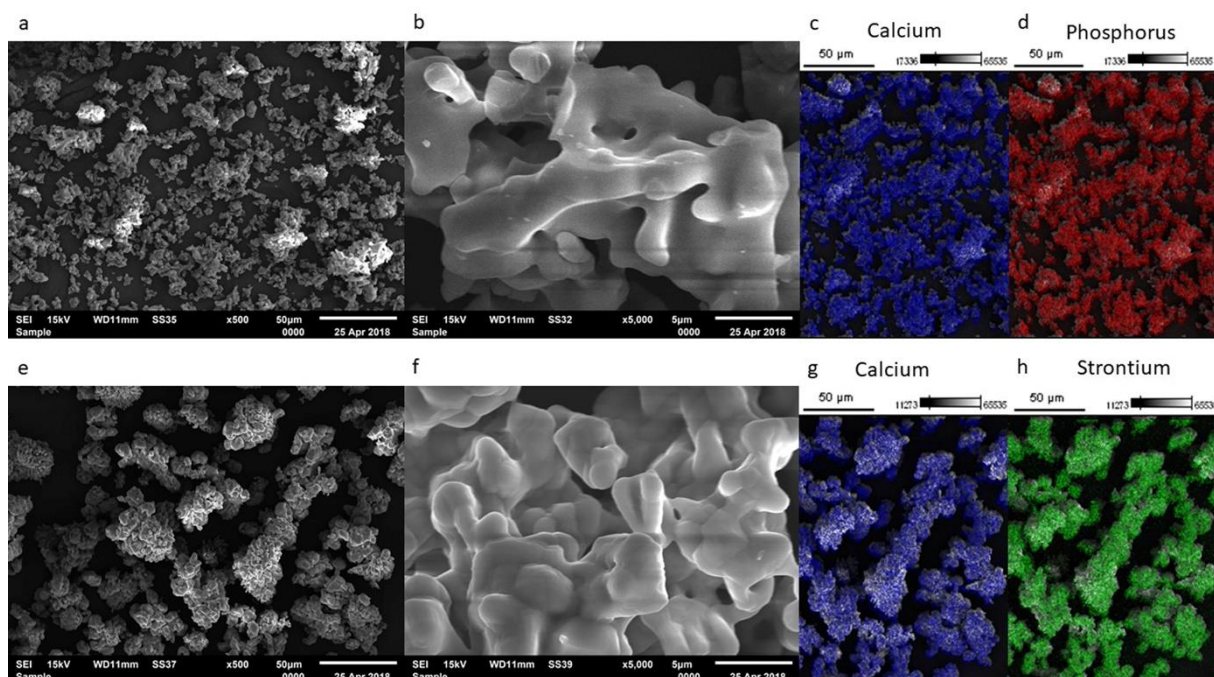


Figure 1. SEM images and EDX elemental mappings (Ca, P, and Sr) of the synthesized HA particles (a,b,c,d) and HASr particles (e,f,g,h).

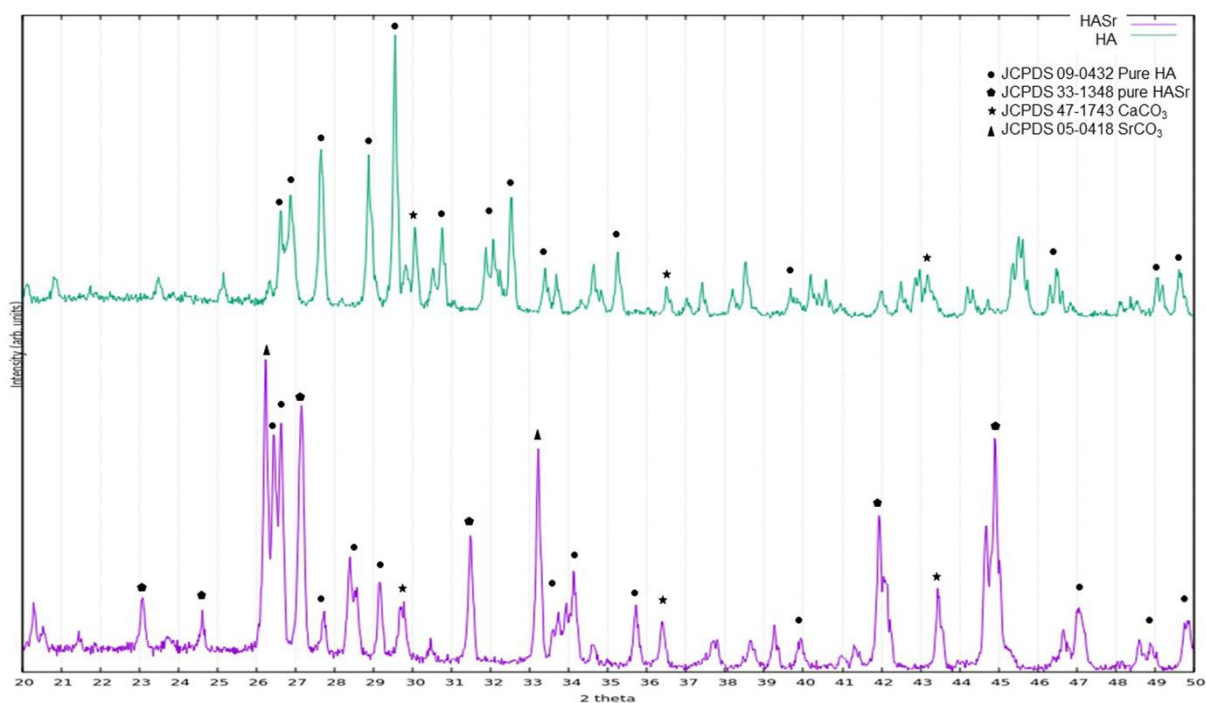


Figure 2. XRD patterns of the synthesized particles: HA (top) and HASr (bottom).

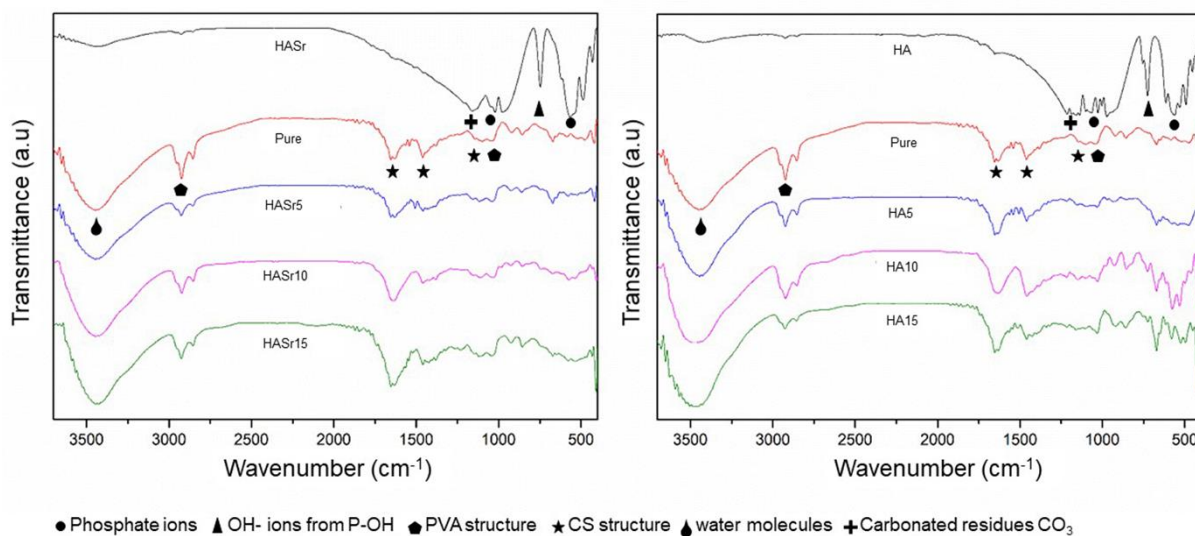


Figure 3. FTIR spectra of HA particles, HASr particles, pure hydrogel, and composite hydrogels with 5, 10, or 15 wt% particles.

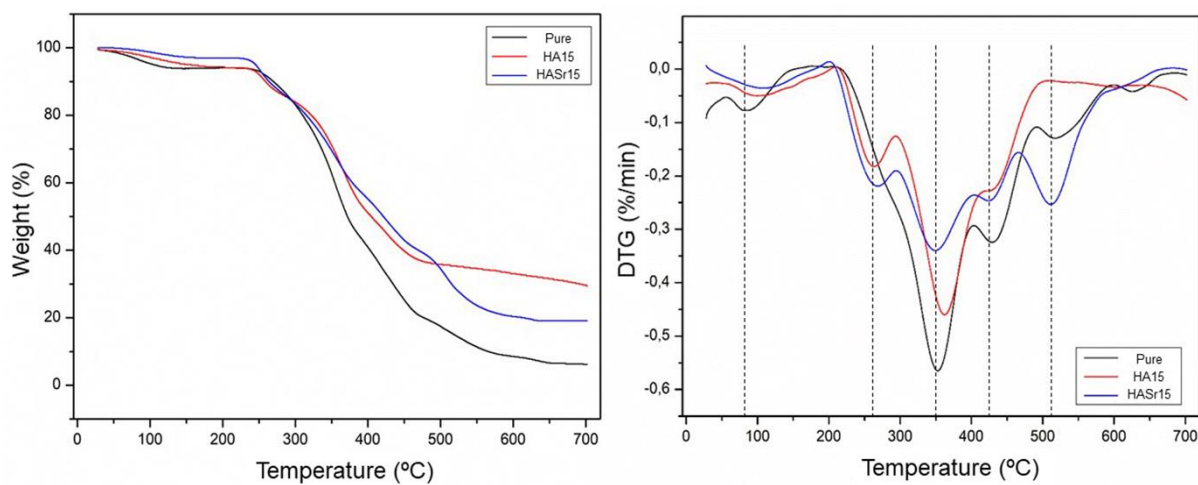


Figure 4. TGA and DTG curves obtained of the pure hydrogel and composite hydrogels with 15 wt% HA or HASr particles.

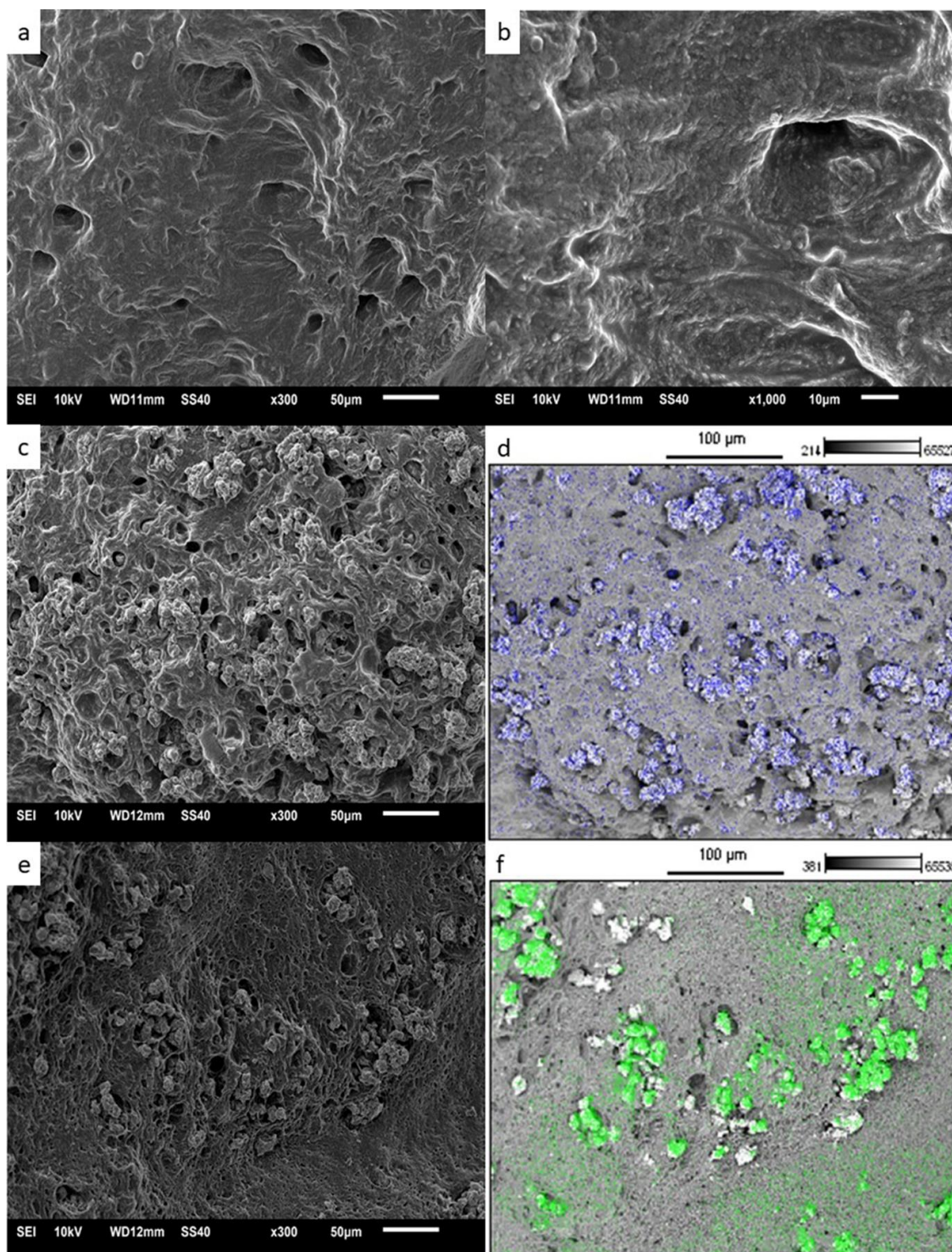


Figure 5. SEM images of pure hydrogel and composite hydrogels containing 10 wt% HA or HASr particles. a,b) pure hydrogel; c) composite hydrogel with 10 % HA; d) EDX elemental mapping of Ca in composite hydrogel shown in c; e) composite hydrogel with 10% HASr; f) EDX elemental mapping of Sr in composite hydrogel shown in e.

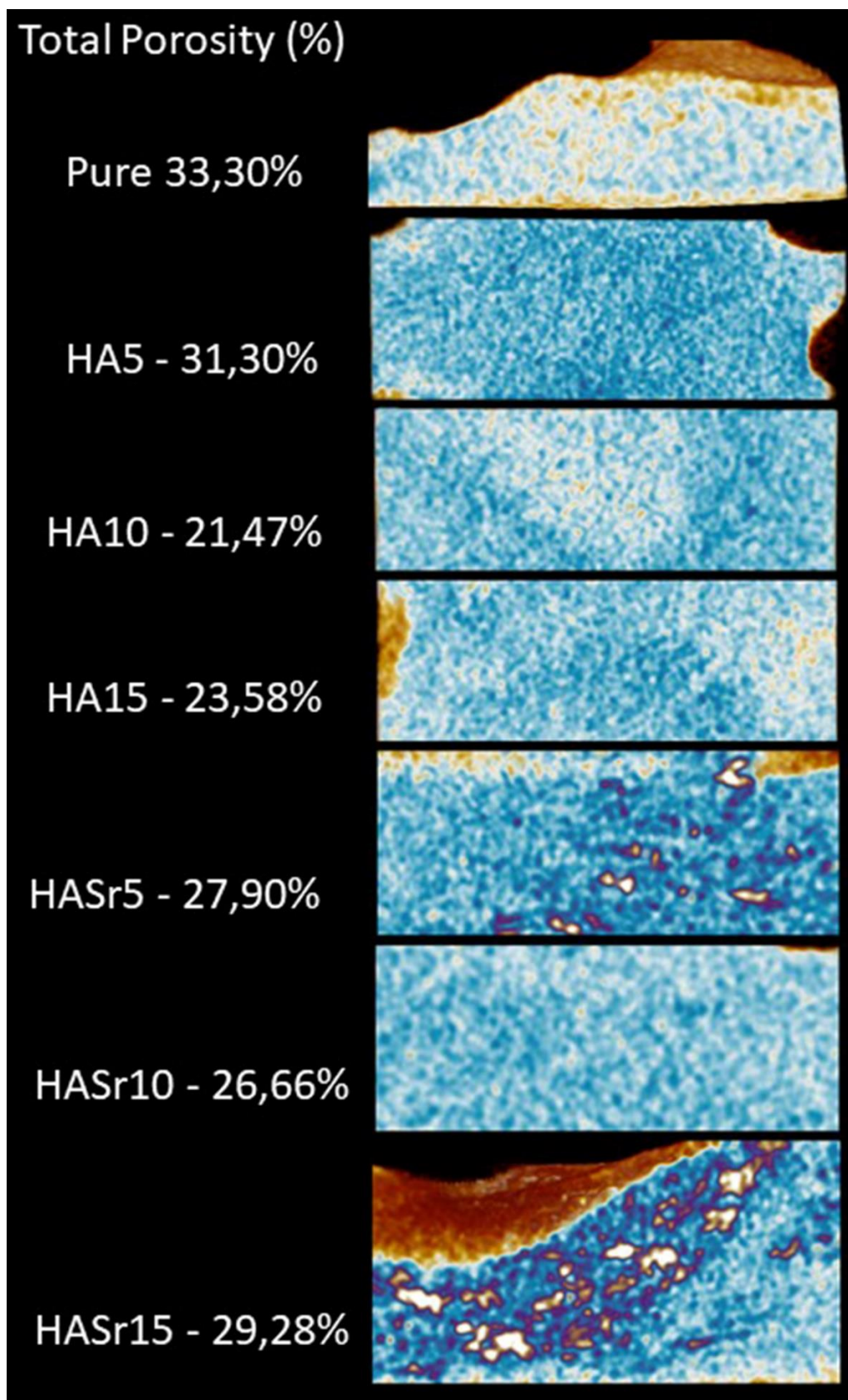


Figure 6. Results of the microCT analysis pure and composite hydrogels containing 5 %, 10 % or 15 wt% of HA or HASr particles.

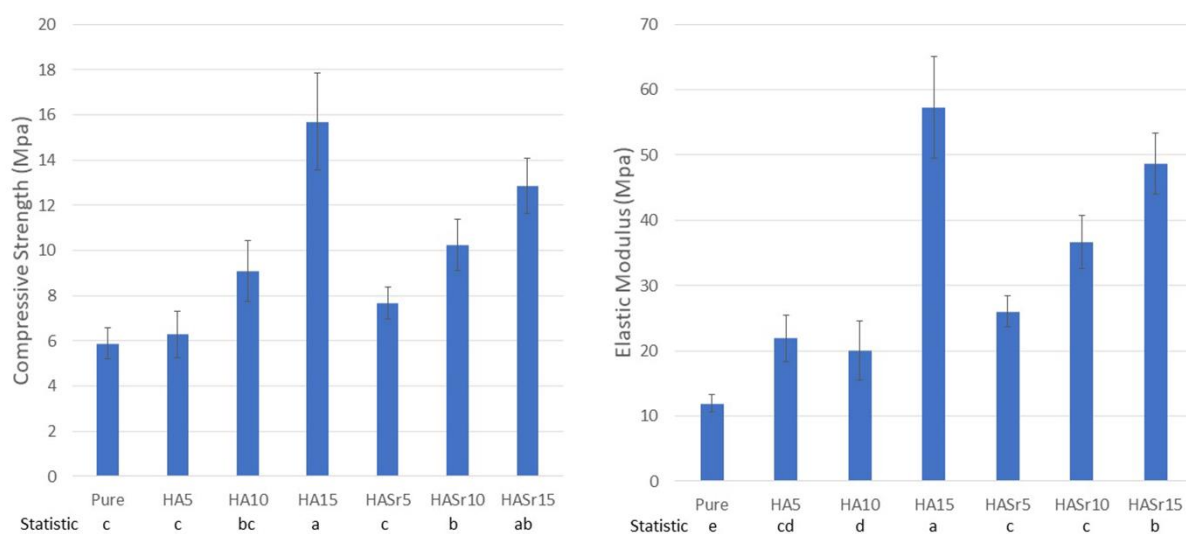


Figure 7. Means $\pm$ standard deviations for compressive strength and elastic modulus of pure and composite hydrogels containing 5 %, 10 % or 15 wt% HA or HASr particles.

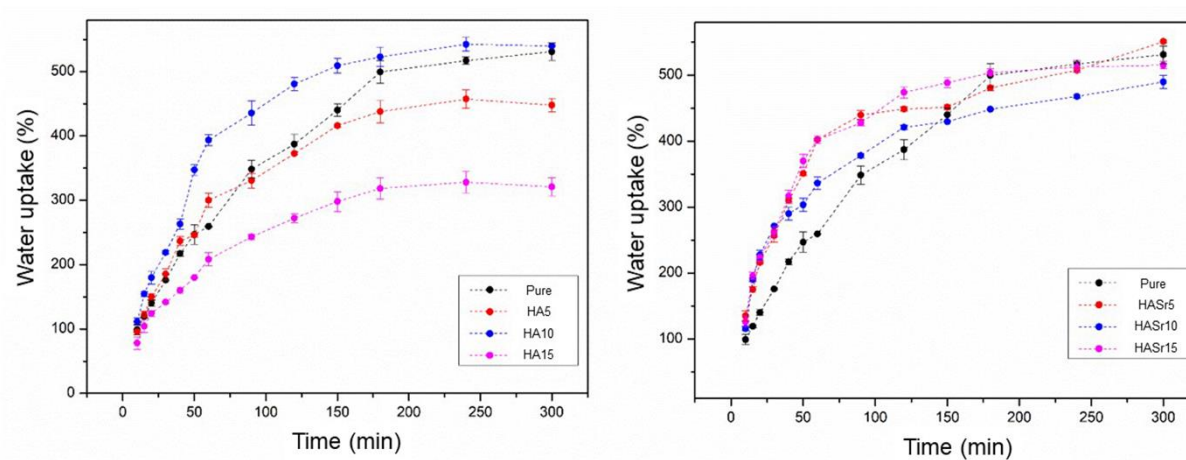


Figure 8. Water uptake (swelling) behavior of pure and composite hydrogels containing 5 %, 10 % or 15 wt% HA or HASr particles in PBS (pH 7.4, 37 °C)

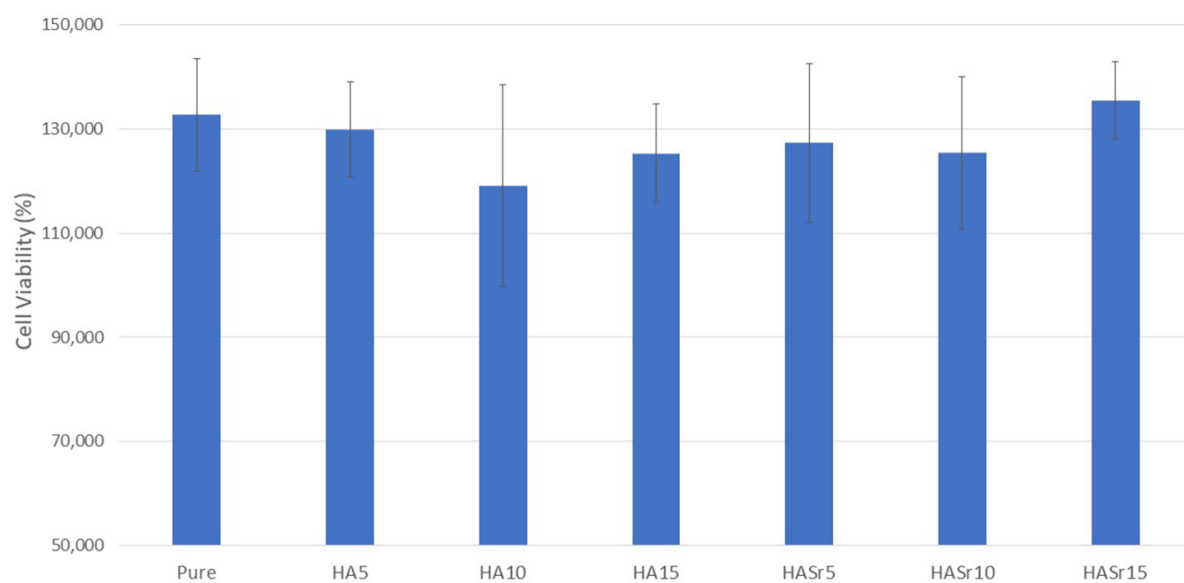


Figure 9. Results for cell viability of pure and composite hydrogels containing 5%, 10% or 15 wt% HA or HASr particles.

5 Considerações finais

Tendo em vista os resultados apresentados no presente trabalho, conclui-se que é possível sintetizar um hidrogel compósito com a adição de até 15% em peso de partículas de Hidroxiapatita de Estrôncio, as quais mantêm a estrutura porosa do hidrogel, sem afetar as suas propriedades químicas, e é capaz de melhorar a resistência mecânica. Além disso, o biomaterial apresentou ótimas características de biocompatibilidade.

Uma adição de partículas maior do que 15% em peso cria precipitados dentro da matriz do hidrogel compósito, evitando a sua dispersão homogênea. Além disso, o hidrogel compósito sintetizado apresenta características manipulativas interessantes para sua aplicação clínica em situações de regeneração em defeitos ósseos.

Os próximos passos incluirão ensaios de proliferação para confirmar a bioatividade dos hidrogéis, ensaios de fosfatase alcalina para observar a capacidade de hidrogéis em induzir diferenciação óssea e testes *in vivo* de regeneração óssea em defeito crítico em modelo animal.

Referências

ALCAIDE, M. et al. Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. **Biomaterials**, 2009a.

ANDERSEN, O. Z. et al. Accelerated bone ingrowth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants. **Biomaterials**, 2013.

ANISHA, B. S. et al. Chitosan-hyaluronan/nano chondroitin sulfate ternary composite sponges for medical use. **Carbohydrate Polymers**, 2013a.

ARAÚJO, M. G.; LILJENBERG, B.; LINDHE, J. Dynamics of Bio-Oss®Collagen incorporation in fresh extraction wounds: An experimental study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, 2010.

BARROS, J. et al. Alginate-nanohydroxyapatite hydrogel system: Optimizing the formulation for enhanced bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, n. July, p. 109985, dez. 2019.

BENIC, G. I.; HÄMMERLE, C. H. F. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. **Periodontology 2000**, 2014a.

BI, S. et al. Construction of physical-crosslink chitosan/PVA double-network hydrogel with surface mineralization for bone repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 224, n. May, p. 115176, 2019.

BIGI, A. et al. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. **Inorganica Chimica Acta**, v. 360, n. 3, p. 1009–1016, fev. 2007.

BIGNON, A. et al. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 12, p. 1089–1097, dez. 2003.

BIZELLI-SILVEIRA, C. et al. Strontium enhances proliferation and osteogenic behavior of bone marrow stromal cells of mesenchymal and ectomesenchymal origins in vitro. **Clinical and Experimental Dental Research**, v. 5, n. 5, p. 541–550, 21 out. 2019.

BODA, S. K. et al. Competing Roles of Substrate Composition, Microstructure, and Sustained Strontium Release in Directing Osteogenic Differentiation of hMSCs. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 23, p. 19389–19408, 14 jun. 2017b.

BONNELYE, E. et al. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, 2008a.

BRAUX, J. et al. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation. **Acta Biomaterialia**, 2011a.

CHANDRAN, S. et al. Osteogenic efficacy of strontium hydroxyapatite micro-granules in osteoporotic rat model. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2016.

CHANDRAN, S. et al. Strontium Hydroxyapatite scaffolds engineered with stem cells aid osteointegration and osteogenesis in osteoporotic sheep model. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 346–354, mar. 2018.

CHOI, S. M. et al. Porous Three-Dimensional PVA/Gelatin Sponge for Skin Tissue Engineering. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 62, n. 7, p. 384–389, mar. 2013.

DA SILVA, G. T. et al. Development, characterization and biocompatibility of chondroitin sulfate/poly(vinyl alcohol)/bovine bone powder porous biocomposite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 72, p. 526–535, mar. 2017.

DERAKHSHAN, Z. H. et al. In situ forming hydrogel based on chondroitin sulfate-hydroxyapatite for bone tissue engineering. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 64, n. 17, p. 919–926, 2015.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337–4351, nov. 2003b.

DWIVEDI, P.; NAYAK, V.; KOWSHIK, M. Role of gold nanoparticles as drug delivery vehicles for chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis. **Biotechnology Progress**, 2015.

FONSECA, J. E.; BRANDI, M. L. Mechanism of action of strontium ranelate: what are the facts? **Clinical cases in mineral and bone metabolism**, v. 7, n. 1, p. 17–8, jan. 2010b.

FRASNELLI, M. et al. Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, n. 1, p. 653–662, 2017.

GALIA, C. R. et al. Caracterização físico-química do enxerto de osso bovino liofilizado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 4, p. 444–451, 2011.

GENTLEMAN, E. et al. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. **Biomaterials**, 2010.

HENROTIN, Y.; MARTY, M.; MOBASHERI, A. What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? **Maturitas**, 2014.

HOSAKA, Y. Z. et al. Diamond squid (*Thysanoteuthis rhombus*)-derived chondroitin sulfate stimulates bone healing within a rat calvarial defect. **Marine Drugs**, 2013.

HOU, R. et al. Magnetic nanohydroxyapatite/PVA composite hydrogels for promoted osteoblast adhesion and proliferation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 318–325, mar. 2013.

HOU, R. et al. Natural polysaccharides promote chondrocyte adhesion and proliferation on magnetic nanoparticle/PVA composite hydrogels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 132, p. 146–154, 2015.

HUANG, T. H. et al. Substitutions of strontium in bioactive calcium silicate bone cements stimulate osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 6, 2019.

ISAAC, J. et al. Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells. **European cells & materials**, v. 21, p. 130–43, 2011.

IVIGLIA, G. et al. Novel bioceramic-reinforced hydrogel for alveolar bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 44, p. 97–109, out. 2016b.

JARDIM, K. V. et al. Physico-chemical characterization and cytotoxicity evaluation of curcumin loaded in chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 56, p. 294–304, 1 nov. 2015.

JOHN, Ł. et al. Strontium-doped organic-inorganic hybrids towards three-dimensional scaffolds for osteogenic cells. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 117–127, nov. 2016.

KIM, T. H. et al. Creating stiffness gradient polyvinyl alcohol hydrogel using a simple gradual freezing–thawing method to investigate stem cell differentiation behaviors. **Biomaterials**, v. 40, p. 51–60, fev. 2015.

LAN, W. et al. Carbon nanotube reinforced polyvinyl alcohol/biphasic calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering. **RSC Advances**, v. 9, n. 67, p. 38998–39010, 2019.

LIN, Y. et al. Synthesis, characterization and antibacterial property of strontium half and totally substituted hydroxyapatite nanoparticles. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.**, v. 23, n. 4, p. 475–479, 11 ago. 2008.

MATSUNO, T. et al. Alveolar bone tissue engineering using composite scaffolds for drug delivery. **Japanese Dental Science Review**, 2010.

NAGATA, M. et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: An immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone**, v. 45, n. 2, p. 339–345, 1 ago. 2009.

NARDONE, V. et al. In Vitro Effects of Strontium on Proliferation and Osteoinduction of Human Preadipocytes. **Stem Cells International**, 2015.

NGAWHIRUNPAT, T. et al. Development of Meloxicam-Loaded Electrospun Polyvinyl Alcohol Mats as a Transdermal Therapeutic Agent. **Pharmaceutical**

Development and Technology, v. 14, n. 1, p. 73–82, 16 jan. 2009.

NYMAN, S. et al. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **Journal of Clinical Periodontology**, 1982.

OBARA, S.; YAMAUCHI, T.; TSUBOKAWA, N. Evaluation of the stimulus response of hydroxyapatite/ calcium alginate composite gels. **Polymer Journal**, v. 42, n. 2, p. 161–166, 6 fev. 2010.

OH, S. H. et al. Wide-range stiffness gradient PVA/HA hydrogel to investigate stem cell differentiation behavior. **Acta Biomaterialia**, v. 35, p. 23–31, 2016.

PANG, L. et al. Chemically and physically cross-linked polyvinyl alcohol-borosilicate gel hybrid scaffolds for bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, n. July, p. 110076, dez. 2019.

PARAMESWARAN-THANKAM, A. et al. Fabrication and characterization of hydroxypropyl guar-poly (vinyl alcohol)-nano hydroxyapatite composite hydrogels for bone tissue engineering. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 29, n. 17, p. 2083–2105, 22 nov. 2018.

PARK, J. W.; KANG, D. G.; HANAWA, T. New bone formation induced by surface strontium-modified ceramic bone graft substitute. **Oral Diseases**, 2016b.

PENG, Z.; KONG, L. X. A thermal degradation mechanism of polyvinyl alcohol/silica nanocomposites. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, n. 6, p. 1061–1071, jun. 2007.

PLACE, E. S. et al. Strontium- and Zinc-Alginate Hydrogels for Bone Tissue Engineering. **Tissue Engineering Part A**, 2011.

QUADRADO, R. F. N. et al. Hybrid hydrogels containing one-step biosynthesized silver nanoparticles: Preparation, characterization and catalytic application. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 79, p. 326–337, 2019.

RAVI, N. D.; BALU, R.; SAMPATH KUMAR, T. S. Strontium-Substituted Calcium Deficient Hydroxyapatite Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Antibacterial Properties. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 95, n. 9, p. 2700–2708, set. 2012.

REIS, E. F. DOS et al. Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein adsorption. **Materials Research**, v. 9, n. 2, p. 185–191, jun. 2006.

SAIDAK, Z.; MARIE, P. J. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. **Pharmacology and Therapeutics**, 2012.

SAILAJA, G. S. et al. Bioinspired mineralization and cell adhesion on surface functionalized poly(vinyl alcohol) films. **Acta Biomaterialia**, 2009.

SARKAR, S. K.; LEE, B. T. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 30, n. 3, p. 279, 2015b.

SHAHZAD, S. et al. Chitosan-based electrospun nanofibrous mats, hydrogels and cast films: novel anti-bacterial wound dressing matrices. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 3, p. 136, 26 mar. 2015.

SHAPIRO, J. M.; OYEN, M. L. Hydrogel Composite Materials for Tissue Engineering Scaffolds. **JOM**, v. 65, n. 4, p. 505–516, 1 abr. 2013.

SHAPIRO, J. M.; OYEN, M. L. Engineering Approaches for Understanding Osteogenesis: Hydrogels as Synthetic Bone Microenvironments. **Hormone and Metabolic Research**, 2016a.

SONG, W. et al. Poly(vinyl alcohol)/collagen/hydroxyapatite hydrogel: Properties and in vitro cellular response. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100A, n. 11, p. 3071–3079, nov. 2012.

TURCO, G. et al. Alginate/hydroxyapatite biocomposite for bone ingrowth: A trabecular structure with high and isotropic connectivity. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1575–1583, 8 jun. 2009.

VENKATESAN, J. et al. Chitosan-amylopectin/hydroxyapatite and chitosan-chondroitin sulphate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1033–1042, 2012.

WOODARD, J. R. et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. **Biomaterials**, v. 28, n. 1, p. 45–54, jan. 2007.

ZHANG, L. et al. Porous hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics promote ectopic osteoblast differentiation from mesenchymal stem cells. **Science and Technology of Advanced Materials**, 2009.

ZHANG, W. et al. Strontium-Substituted Submicrometer Bioactive Glasses Modulate Macrophage Responses for Improved Bone Regeneration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 45, p. 30747–30758, 16 nov. 2016.

ZHU, H. et al. 3D plotting of highly uniform $\text{Sr}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ bioceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 37, p. 6200–6212, 2016.

Apêndices

Apêndice A – Nota da Tese

Síntese e caracterização de novo hidrogel compósito contendo hidroxiapatita de estrôncio

Synthesis and characterization of a novel composite hydrogel with strontium-doped hydroxyapatite

A formação rápida de novo osso é pré-requisito para restauração estética e funcional do tecido perdido. O objetivo deste trabalho foi preparar um biomaterial potencialmente aplicável para regeneração óssea à base de uma matriz de hidrogel modificada com partículas de Hidroxiapatita (HA) e Hidroxiapatita de Estrôncio (HASr). As partículas foram sintetizadas pelo método de precipitação húmida e calcinação e os hidrogéis foram preparados a partir de misturas dos polímeros poli(álcool vinílico) (PVA) e sulfato de condroitina (SC) utilizando a técnica de congelamento/descongelamento. Durante esse processo, diferentes quantidades de HA ou HASr (0, 5, 10 ou 15% em massa) foram adicionadas à formulação dos hidrogéis. A través dos testes desenvolvidos a obtenção das partículas de HA e HASr foi confirmada junto com a obtenção de Hidrogéis compósitos com diferentes concentrações de partículas adicionadas. O teste de viabilidade celular revelou um aumento na quantidade de células em todos os grupos, incluindo o hidrogel controle (sem partículas). Em conclusão, um hidrogel composto modificado com até 15% em peso de partículas de HA ou HASr foi sintetizado com sucesso com propriedades físico-químicas aprimoradas em comparação com o hidrogel de controle, mostrando também características manipulativas promissoras.

Campo da pesquisa: Biomateriais e Biologia Oral/Materiais Odontológicos.

Candidato: Guillermo Grazioli

Data da defesa e horário: 06/03/2020 14:00 hrs

Local: Auditório do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. 5º andar da Faculdade de Odontologia de Pelotas. Rua Gonçalves Chaves, 457.

Membros da banca: Prof^a. Dr. Giana Lima. Doutora em Odontologia (Materiais Odontológicos) pela Universidade Federal de Pelotas; Prof. Dr. Marcus Christian

Muniz Conde. Doutor em Odontologia (Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas; Prof. Dr. Carlos Cuevas-Suárez. Doutor em Odontologia (Materiais Odontológicos) pela Universidade Federal de Pelotas; Prof. Dr. Alexandre Chisini. Doutor em Odontologia (Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas; Prof. Dr. Matheus Bertolini. Doutor em Odontologia (Prótese Dental) pela UNICAMP

Orientador: Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes. Doutor em Materiais Dentários pela Universidade Estadual de Campinas.

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Adriana Fernandes da Silva. Prof. Dr. André Ricardo Fajardo. Prof. Dr. Sergio da Silva Cava

Informação de contato: Guillermo Grazioli, ggrazioli@gmail.com. Gral. Las Heras 1925, Montevideo, Uruguay.

Apêndice B – Súmula do currículo do candidato

Guillermo Grazioli nasceu em 1990, em Montevideo, Uruguai. Completou o ensino fundamental na *Scuola Italiana di Montevideo*, Montevideo, Uruguai. No ano 2010 ingressou na *Facultad de Odontología, UdelaR*, tendo sido graduado cirurgião-dentista em 2015. Em 2011 ingressou como *Ayudante* no departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia – UdelaR, onde atualmente trabalha como *Profesor Adjunto*. Em 2015 iniciou a Especialização em Implantodontia na Faculdade de Odontologia – UdelaR a qual finalizou em 2019. Em 2016 iniciou o Doutorado na Universidade Federal de Pelotas (UFPel) na área de Materiais Odontológicos sob orientação do Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes.

Publicações:

Conde MCM, Chisini LA, Grazioli G, Francia A, Carvalho RV de, Alcázar JCB, et al. Does Cryopreservation Affect the Biological Properties of Stem Cells from Dental Tissues? A Systematic Review. *Braz Dent J* 2016;27:633–40.

Chisini LA, Conde MCM, Grazioli G, San AS. Venous Blood Derivatives as FBS-Substitutes for Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Scoping Review 2017;28:1–12.

Grazioli G, Valente LL, Isolan CP, Pinheiro HA, Duarte CG, Münchow EA. Bleaching and enamel surface interactions resulting from the use of highly-concentrated bleaching gels. *Arch Oral Biol* 2018;87:157–62.

Cuevas-Suárez C, Pimentel-García B, Rivera-Gonzaga A, Álvarez-Gayosso C, Ancona-Meza A, Grazioli G, et al. Examining the Effect of Radiant Exposure on Commercial Photopolimerizable Dental Resin Composites. *Dent J* 2018;6:55.

Chisini LA, Grazioli G, Francia A, Martin ASS, Demarco FF, Conde MCM. Revascularization versus apical barrier technique with mineral trioxide aggregate plug: A systematic review. *G Ital Endod* 2018;32:9–16.

Chisini LA, Cademartori MG, Francia A, Mederos M, Grazioli G, Conde MCM, et al. Is the use of Cannabis associated with periodontitis? A systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res* 2019;54:311–7.

Grazioli G, Francia A, Cuevas-Suárez CE, Zanchi CH, Moraes RR De. Simple and Low-Cost Thermal Treatments on Direct Resin Composites for Indirect Use. *Braz Dent J* 2019;30:279–84.

Chisini LA, Conde MCM, Grazioli G, Martin ASS, Carvalho RV De, Sartori LRM, et al. Bone, Periodontal and Dental Pulp Regeneration in Dentistry: A Systematic Scoping Review. *Braz Dent J* 2019;30:77–95.

Anexos

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UFPEL - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do desempenho biológico de biomateriais de interesse para odontologia

Pesquisador: Adriana Fernandes da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 64527316.4.0000.5318

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas/ FO-UFPEL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.078.368

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_831414.pdf	06/04/2017 10:45:09		Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	06/04/2017 10:44:16	Adriana Fernandes da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ApDmodificado.docx	06/04/2017 10:35:28	Adriana Fernandes da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ApCmodificado.docx	06/04/2017 10:34:54	Adriana Fernandes da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ApA_modificado.docx	06/04/2017 10:33:57	Adriana Fernandes da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_adri.docx	06/04/2017 10:33:06	Adriana Fernandes da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_ciencia.docx	05/12/2016 17:26:05	Adriana Fernandes da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ApE_Saliva.docx	05/12/2016 17:05:46	Adriana Fernandes da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_assent_ApenB.doc	05/12/2016 17:05:22	Adriana Fernandes da Silva	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	05/12/2016 16:21:18	Adriana Fernandes da Silva	Aceito

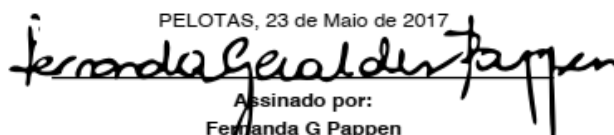
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 23 de Maio de 2017



Assinado por:
Fernanda G Pappen

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética e Experimentação Animal



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
78/2019/CEEA/REITORIA
23110.008303/2019-47

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Síntese, caracterização e aplicação de hidrogel compósito contendo Hidroxiapatita e Hidroxiapatita de Estrôncio para regeneração óssea**”, registrada com o nº **23110.008303/2019-47**, sob a responsabilidade de **Rafael Ratto de Moraes** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **15 de agosto de 2019**.

Solicitamos que seja corrigido o nome da chefe do Biotério Central e que a mesma assine o TCLE.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	20/08/2019 a 20/12/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de animais	50
Idade	5 a 6 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEEA 8303-2019

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA