

**Coleta de dados para revisão sistemática para resposta biológica *in vitro* de biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio dopadas com Magnésio**

**Data collection for systematic review for *in vitro* biological response of magnesium-doped calcium phosphate-based bioceramics**

DOI:10.34117/bjdv7n10-374

Recebimento dos originais: 07/09/2021

Aceitação para publicação: 27/10/2021

**Ariane Pogere**

Farmacêutica, pela Instituição Faculdades Pequeno Príncipe  
Instituição: Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Endereço: Av. Sete de Setembro, 3165, Bairro Rebouças - Curitiba, Paraná, CEP:  
80230-901

E-mail: ari.pogere@gmail.com

**Gustavo Xavier Peres**

Graduando em Engenharia Mecânica, pela Instituição Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná

Instituição: Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Endereço: Av. Sete de Setembro, 3165, Bairro Rebouças - Curitiba, Paraná, CEP:  
80230-901

E-mail: gustavoperes@alunos.utfpr.edu.br

**José Ferreira da Silva Junior**

Doutor, pela Instituição Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Instituição: Universidade Federal da Integração Latino-Americana

Endereço: Av. Tancredo Neves, 6731, PTI-ITAIPU, Foz do Iguaçu, Paraná, CEP:  
69077-000

E-mail: j.ferreira@unila.edu.br

**Marco Augusto Stimamiglio**

Doutor, pela Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Carlos Chagas.

Endereço: Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775, CIC, Curitiba, Paraná, CEP:  
81350010

E-mail: marco.stimamiglio@fiocruz.br

**João Antônio Palma Setti**

Doutor, pela Instituição Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Instituição: Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Endereço: Av. Sete de Setembro, 3165, Bairro Rebouças - Curitiba, Paraná, CEP:  
80230-901

E-mail: setti@utfpr.edu.br

**Lucas Freitas Berti**

Doutor, pela Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição: Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Endereço: Av. Sete de Setembro, 3165, Bairro Rebouças - Curitiba, Paraná, CEP:  
80230-901  
E-mail: lenberti@gmail.com

## RESUMO

A engenharia de tecidos ósseos vem estudando materiais biocompatíveis que possam ser utilizados na produção de implantes e próteses ósseas. As biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita, são biocompatíveis e possuem alta capacidade de osteointegração. A fim de obter respostas biológicas mais adequadas, pesquisas têm sido feitas dopando as biocerâmicas com íons metálicos, como Magnésio e o melhor conhecimento do efeito desses dopantes quando implantados, traz oportunidades de melhorias para as cirurgias e diminuição dos efeitos adversos. Este trabalho mostra a coleta de dados de um estudo preliminar sobre a avaliação das respostas biológica *in vitro* para biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio modificadas com magnésio, para a posterior elaboração de uma revisão sistemática. Foram escolhidas palavras-chave relacionadas com o tema e realizado buscas nas bases de dados PubMed, EmBase, Scopus e Web Of Science utilizando o ensaio ALP com medidas de densidade óptica como critério de comparação. Em relação a coleta de dados, os resultados apresentaram falta de padronização e alta heterogeneidade em decorrência da arbitrariedade na concentração do dopante e nos períodos de avaliação das amostras, dificultando a comparação entre estudos. Com isso, esforços são necessários para o desenvolvimento de protocolos que viabilizem a obtenção de dados mais adequados para a comparação.

**Palavras-chave:** Hidroxiapatita, Biocerâmicas, Engenharia de tecidos, Resposta biológica, testes *in vitro*.

## ABSTRACT

Bone tissue engineering has been studying biocompatible materials that can be used in the production of bone implants and prostheses. Bioceramics based on calcium phosphates, such as hydroxyapatite, are biocompatible and have a high capacity for osseointegration. In order to obtain more adequate biological answers, researches have been carried out doping bioceramics with metallic ions, such as Magnesium, and the better knowledge of the effect of these dopants when implanted, brings opportunities for improvement in surgeries and reduction of adverse effects. This work shows the collection of data from a preliminary study on the evaluation of *in vitro* biological responses to calcium phosphate-based bioceramics modified with magnesium, for the subsequent elaboration of a systematic review. Keywords related to the topic were chosen and searches were performed in the PubMed, EmBase, Scopus and Web Of Science databases using the ALP assay with optical density measurements as a comparison criterion. Regarding data collection, the results showed a lack of standardization and high heterogeneity due to arbitrary dopant concentration and sample evaluation periods, making comparisons between studies difficult. Thus, efforts are needed to develop protocols that make it possible to obtain more adequate data for comparison.

**Keywords:** Hydroxyapatites, Bioceramics, Tissue engineering, Biological response, *In vitro* tests.

## 1 INTRODUÇÃO

O principal responsável por garantir a movimentação do corpo e sua estabilidade é o tecido ósseo. Lesões nesse tecido afetam a homeostase óssea, prejudicando a cicatrização e remodelação do osso. Pensando nisso, a medicina e a engenharia buscam evoluções para que a restauração do tecido ósseo lesionado ocorra de forma rápida e eficaz Bosch-Rué *et al.* (2021). Existem dois tipos mais comuns para realizar procedimentos de enxertos ósseos, o padrão ouro se dá pelo método natural, que pode ser autoenxerto, quando o osso é proveniente do próprio paciente e reimplantado no local afetado ou aloenxertos, quando o tecido é obtido de cadáveres ou através de uma doação humana. Contudo, são procedimentos complexos e possuem disponibilidade limitada, além de serem possíveis formas de transmissão de doenças e alta possibilidade de rejeição Gu, *et al.* (2019).

Complicações pós-operatórias como inflamações no tecido e infecções bacterianas são preocupantes e constituem grande risco para o paciente, aumentando o tempo de internação hospitalar e a angiogênese, processo de formação de vasos sanguíneos, é uma das etapas consideradas decisivas para uma regeneração tecidual bem sucedida. Com a finalidade de minimizar os problemas após os procedimentos de implantes ósseos, pesquisas são conduzidas para buscar materiais sintéticos e biocompatíveis para obter uma regeneração óssea de sucesso Bosch-Rué *et al.* (2021).

Com o avanço da Engenharia Biológica, os materiais a base de fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita (HAp), vem sendo amplamente estudados para a utilização em restaurações ósseas devido suas características semelhantes à fase mineral do tecido ósseo e alta capacidade de osteointegração Oliveira, *et al.* (2020). Segundo Yedekçi *et al.* (2021), a HAp de origem biológica possui em sua composição natural íons como o Magnésio (Mg), Estrôncio (Sr), Sódio (Na), Zinco (Zn) e Flúor (F), sendo assim estudos com a dopagem de biocerâmicas com estes e outros íons têm sido conduzidos para a avaliar a resposta biológica.

A biocerâmica quando dopada com íons orgânicos apresenta alterações importantes nas características químicas e físicas, favorecendo os implantes, porém, com a complexidade dos processos e a alta variedade de íons que podem ser incorporados, a interação desses materiais e sua atividade biológica devem ser estudados para o aperfeiçoamento desses processos Garbo *et al.* (2019). Íons orgânicos, como o Mg, apresentam resultados positivos quando em relação a resposta biológica quando comparados a amostras sem dopagem. O íon Mg tem apresentado um papel importante

na remodelação óssea, aumentando a atividade ALP e proliferação dos osteoblastos, evitando a perda gradual da massa óssea, inibindo a fragilidade óssea Garbo *et al.* (2019) Bosch-Rué *et al.* (2021).

Notando as características dos íons orgânicos sobre as biocerâmicas, surgiu o interesse em elaborar uma pesquisa para verificar a influência dos íons dopantes quando comparados às biocerâmicas sem dopagem e, para isso, o ensaio de fosfatase alcalina (ALP) foi utilizado como marcador de resposta biológica. Por fim, o objetivo principal desta revisão é verificar a viabilidade da pesquisa final.

## 2 MÉTODO

Para efetuar a pesquisa dos artigos originais nas bases de dados, foram utilizadas sete palavras-chave que se relacionaram com o tema: “*Hydroxyapatite*”, “*Calcium Phosphate*”, “*Ceramics*”, “*Biom mineralization*”, “*Bone Regeneration*”, “*Gene Expression*”, “*Cell Proliferation*”, “*Cell Differentiation*” e “*Magnesium*”. As pesquisas foram conduzidas em 14 de setembro de 2021 nas bases de dados PubMed, EmBase, Scopus e Web Of Science com os critérios de inclusão sendo apenas artigos em língua inglesa e publicados entre 2016 e 2021. Critérios PICOS Amir-Behghadami; Janati (2020) foram utilizados para definir a população do estudo, que foi atribuída à estudos *in vitro*, a intervenção foi definida como a dopagem de biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio com íons de Magnésio (Mg), para o controle foram utilizadas as mesmas biocerâmicas sem a dopagem, os desfechos foram definidos como os valores de ensaio de fosfatase alcalina (ALP) para a avaliação da resposta biológica e tipo de estudo sendo somente artigos em periódicos. A pergunta a ser respondida pela revisão sistemática é: “biocerâmicas à base de fosfato de cálcio dopadas com íon de Mg apresentam melhor resposta biológica em comparação com uma biocerâmica sem dopagem?”.

A primeira fase de seleção dos artigos foi realizada baseando-se apenas no título e resumos dos trabalhos, já na segunda fase foi realizada a leitura dos artigos completos que foram selecionados na primeira fase. Os dados extraídos dos estudos foram: Tipo de biocerâmica à base de fosfatos de cálcio, íons utilizados e sua porcentagem de dopagem, tipo de célula utilizada nos ensaios *in vitro*, período de avaliação e números de corpos de prova. Para a elaboração da meta-análise dos desfechos, foram extraídos os valores de ensaio de ALP e considerados média e desvio padrão das amostras em cada período de tempo avaliado. A extração de dados dos gráficos de cada estudo foi feita utilizando software de tratamento de imagens Image J (“ImageJ” Fiji 1.51n, ImageJ, National

Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (<https://imagej.nih.gov/ij/>) utilizando o plug-in Figure Calibration desenvolvido por Frederic Hessman ([http://www.astro.physik.uni-goettingen.de/~hessman/ImageJ/Figure\\_Calibration/](http://www.astro.physik.uni-goettingen.de/~hessman/ImageJ/Figure_Calibration/)).

A meta-análise dos dados extraídos dos estudos foi realizada utilizando o software Review Manager Version 5.4.1 (Copenhagen, The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2012). Os dados utilizados para essa meta-análise foram obtidos dos resultados dos ensaios ALP dos artigos selecionados na segunda fase e foram calculadas a diferença das médias padronizadas com um intervalo de confiança de 95% para cada ensaio. Para ilustrar os desfechos obtidos pelos ensaios foram utilizados gráficos de floresta e de funil e o valor de  $I^2$  foi utilizado para avaliar a heterogeneidade dos estudos. Para avaliar as variáveis metodológicas encontradas nos artigos que impactam nas respostas biológicas, os estudos foram divididos em subgrupos, como porcentagem de dopagem e dias de avaliação das amostras.

A meta-análise dos estudos realizados com a dopagem da biocerâmica com o íon Mg foi realizada com um total de seis artigos que utilizaram amostras com valores comparáveis e no período de avaliação de 7, 10 e 14 dias. A avaliação de risco de viés não foi realizada por se tratar de um estudo preliminar para investigação da possibilidade de realização do estudo final. Os artigos selecionados para a leitura completa foram: Liu *et al.* (2021), Szurkowska *et al.* (2021), Yedekçi *et al.* (2021), Ballouze *et al.* (2021), Bosch-Rué *et al.* (2020), Santos *et al.* (2021), Cheng *et al.* (2020)<sup>2</sup>, Garbo *et al.* (2020), Chen *et al.* (2019), Kazimierczak *et al.* (2019), He *et al.* (2019), Zhang *et al.* (2019), Tripathi *et al.* (2018), Geng *et al.* (2016), Huang *et al.* (2016), Arkin *et al.* (2021), Correa-Piña *et al.* (2021), Shoba *et al.* (2020), Li *et al.* (2020), Vranceanu *et al.* (2020), Go *et al.* (2020), Gu *et al.* (2019), Guo *et al.* (2019), Ghițulică *et al.* (2019), Kozuma *et al.* (2019), Veljovic *et al.* (2019), Ke *et al.* (2018), Shahrezaee *et al.* (2017), Parra *et al.* (2017), Singh *et al.* (2016a), Singh *et al.* (2016b) e Wang *et al.* (2016).

### 3 RESULTADOS

As pesquisas realizadas referente ao íon Mg resultaram em um total de 1.304 artigos encontrados nas quatro bases consultadas. A partir desses resultados 1.263 artigos foram descartados na fase de avaliação de títulos e resumos, pois não se enquadraram nos critérios de inclusão e/ou estavam já haviam sido selecionados em outra base de dados, e um total de 32 artigos foram lidos na íntegra. A quantidade de artigos encontrados em cada base de dados está descrita no Quadro 1. Dos artigos lidos por completo, seis foram

selecionados para a meta-análise e estão apresentados no Quadro 2 juntamente com os dados extraídos de cada estudo avaliado.

Quadro 1 – Resultados da pesquisa em cada base de dados consultada

Base de dados	Resultado da pesquisa
Scopus	498
PubMed	100
EmBase	361
Web Of Science	345

Fonte: Autoria própria (2021).

Quadro 2 – Dados extraídos dos estudos selecionados

Autor Principal	Ano de Publicação	Tipo de Material	Tipo de células	Íon dopantes
Chen <i>et al</i>	2019	HAp	Osteoblast-like cells (MC3T3-E1)	Mg
Gu <i>et al</i>	2019	$\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP)	Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBMSCs) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)	Mg
Guo <i>et al</i>	2019	$\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP)	Bone marrow stromal cells (BMSCs)	Mg
Singh <i>et al</i>	2016	$\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP)	Human mesenchymal stem cell (hMSC)	Mg
Shahrezaee <i>et al</i>	2017	Amorphous Calcium Phosphate (ATCP)	Human osteosarcoma cell lines (G-292)	Mg
Wang <i>et al</i>	2016	Calcium Phosphate Cement (CPC)	Rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and murine-derived macrophage cell line (RAW 264.7)	Mg

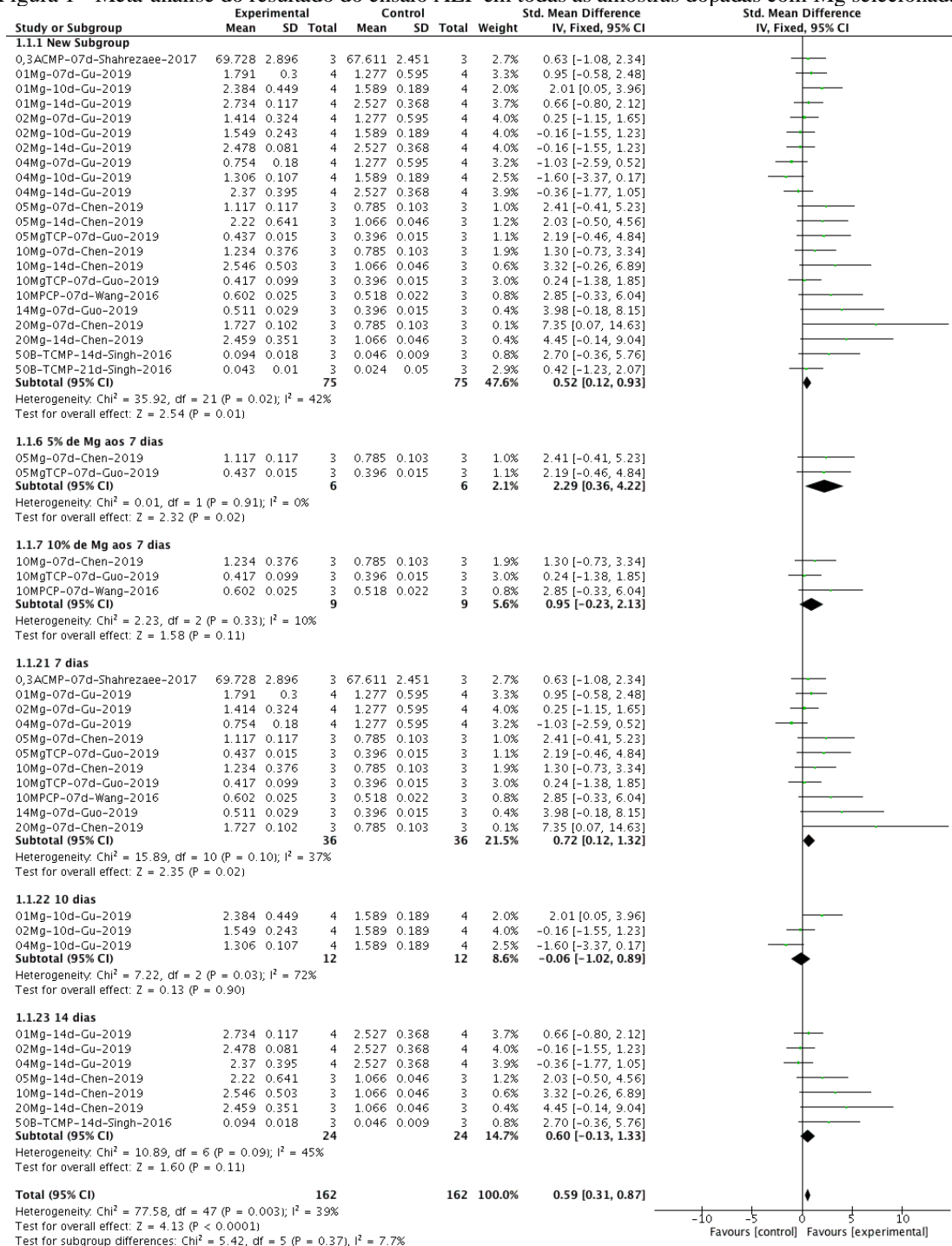
Fonte: Autoria própria (2021)

Para melhor visualização, os estudos selecionados foram divididos em grupos e os dados extraídos foram: Tipo de material de biocerâmica a base de fosfatos de cálcio, tipo de célula utilizada para os ensaios *in vitro* e os íons dopantes estudados. Dentre os artigos avaliados, o tipo de material mais utilizado foi a hidroxiapatita, seguido de outros tipos de fosfatos de cálcio, como o  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP). Considerando os tipos de células para os ensaios *in vitro*, células tronco foram as mais utilizadas, seguido de osteoblastos. Quanto aos íons dopantes, o foco da pesquisa foi para o íon de Mg, contudo,

artigos não utilizados na revisão também utilizaram outros íons, como Estrôncio (Sr), Zinco (Zn), Silício (Si), Cobre (Cu), Bário (Ba) e Boro (B).

Para avaliar a atividade biológica das amostras dopadas e não dopadas, a meta-análise avaliou os resultados obtidos através de ensaios ALP, visto que a fosfatase alcalina é um importante indicador de formação de tecidos duros Yedekçi *et al.* (2021). **A Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta o resultado geral da meta-análise.

Figura 1 - Meta-análise do resultado do ensaio ALP em todas as amostras dopadas com Mg selecionadas



Fonte: Autoria própria (2021).

Conforme apresentado na Figura 1, nas amostras dopadas com 5% de Mg e avaliadas aos 7 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 2,29 à favor da amostra dopada com 95% do intervalo de confiança entre 0,36 e 4,22. Já nas amostras dopadas com 10% de Mg e avaliada aos 7 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 0,95 à favor da amostra dopada com 95% do intervalo de confiança entre -0,23 e 2,13. Esses resultados mostram que, quando as amostras dopadas foram avaliadas aos 7 dias, a expressão de ALP indicou um aumento de atividade osteogênica, favorecendo a proliferação e diferenciação das células estudadas. Segundo Gu *et al.* (2019) o íon Mg quando adicionado em uma concentração de 50ppm (aproximadamente 2 mM), apresenta resultado favorável à proliferação e diferenciação de pré-osteoblastos em ensaios *in vitro*, todavia concentrações maiores desse íon se torna prejudicial, afetando a deposição de íons orgânicos.

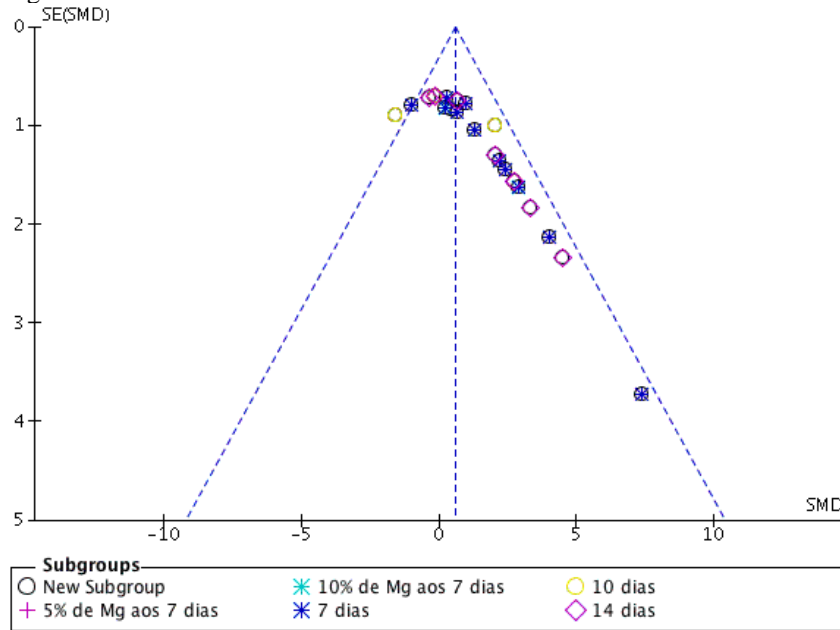
Uma segunda análise foi realizada separando os estudos por dias de avaliação, assim, nota-se uma extensa diversidade de concentrações do dopante em diversos períodos de avaliação das amostras, tornando a comparação entre os estudos impossibilitada, e.g. as amostras avaliadas aos 7 dias tiveram concentrações do dopante de 0,3% a 20% e nas amostras dopadas e avaliadas aos 14 dias, as concentrações do dopante variaram de 1% a 50%. Quando analisamos os dias de avaliação, reparamos uma falta de padrão, pois estudos avaliam as amostras dopadas após 3 e 5 dias, outros 7 e 14 dias ou então 14 e 21 dias. A variância dos valores de ALP encontrados nos estudos incluídos fez com que a heterogeneidade apresentasse um alto valor, i.e.  $I^2$  é de 39%.

Para obter uma comparação satisfatória a mesma porcentagem do dopante avaliada exatamente ao mesmo período de tempo é imprescindível. Mesmo o resultado geral desse experimento mostrando-se favorável a biocerâmica dopada, a alta heterogeneidade nos estudos e falta de um protocolo a ser seguido mostram que estudos necessitam serem realizados para obter uma comparação efetiva.

O gráfico de funil dessa meta-análise, considerando todos os estudos incluídos, está representado na Figura 2.



Figura 2 - Gráfico de funil da meta-análise contendo todos os estudos incluídos



Fonte: Autoria própria (2021).

Em relação aos vieses de publicação, o gráfico de funil demonstra o porquê mais estudos são necessários. Quando ocorrer o preenchimento dos “espaços vazios” do gráfico, mais peso estatístico para a resposta da pergunta dessa revisão sistemática é oferecido.

#### 4 CONCLUSÃO

O resultado geral da pesquisa trouxe um grande número de artigos através das estratégias de busca que foram utilizadas, o que permitiu uma observação de diversos métodos para análises *in vitro* do desempenho das biocerâmicas a base de fosfatos de cálcio dopadas com o íon Mg. Entretanto, a meta-análise elaborada nos mostrou uma grande heterogeneidade estatística encontrada nos artigos selecionados. Através da meta-análise dos ensaios ALP foi possível observar um desempenho favorável das biocerâmicas dopadas com 5% de Mg no período avaliado de 7 dias, porém há estudos que mostram um desempenho osteogênico afetado quando a concentração de dopagem é mais alta. Contudo, os estudos apresentaram grande variabilidade nas concentrações do dopante, impossibilitando a comparação efetiva entre eles.

### **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq – Brasil. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores gostariam de agradecer ao Centro Multiuso de Caracterização de Materiais-CMCM da UTFPR-CT.

## REFERÊNCIAS

AMIR-BEHGHADAMI, M., JANATI, A. "Population, Intervention, Comparison, Outcomes and Study (PICOS) design as a framework to formulate eligibility criteria in systematic reviews". *Emergency Medicine Journal*. BMJ Publishing Group. 2020. Disponível em: <https://emj.bmj.com/content/37/6/387>. Acesso em: 09 de setembro de 2021.

ARKIN, V. H., NARENDRAKUMAR, U., MADHYASTHA, H., *et al.* "Characterization and In Vitro Evaluations of Injectable Calcium Phosphate Cement Doped with Magnesium and Strontium". *ACS Omega*, 6, 4, 2477–2486. 2021. Disponível em: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1021/acsomega.0c03927>. Acesso em: 20 de setembro de 2021.

BALLOUZE, R., MARAHAT, MH, MOHAMAD, S., *et al.* "Biocompatible magnesium-doped biphasic calcium phosphate for bone regeneration". *J Biomed Mater Res*. 109: 1426–1435. 2021. Disponível em: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1002/jbm.b.34802>. Acesso em: 17 de setembro de 2021.

BOSCH-RUÉ, E., DIEZ-TERCERO, L., GIORDANO-KELHOFFER, B. *et al.* "Biological Roles and Delivery Strategies for Ions to Promote Osteogenic Induction". *Front. Cell Dev. Biol.* 8:614545. 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.614545/full>. Acesso em: 17 de setembro de 2021.

CHEN, S., SHI, Y., ZHANG, X., MA, J. "Biomimetic synthesis of Mg-substituted hydroxyapatite nanocomposites and three-dimensional printing of composite scaffolds for bone regeneration". *J Biomed Mater Res*. 107:2512–2521. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/epdf/10.1002/jbm.a.36757>. Acesso em: 19 de setembro de 2021.

CHENG, S., WANG, W., WANG, D., *et al.* "An in vitro and in vivo comparison of Mg(OH)<sub>2</sub>, MgF<sub>2</sub> and HA-coated Mg in degradation and osteointegration". *Biomaterials Sci*. 2020. Disponível em: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1039/D0BM00467G>. Acesso em: 19 de setembro de 2021.

CORREA-PIÑA, B. A., GOMEZ-VAZQUEZ, O. M., LONDOÑO-RESTREPO, S. M. *et al.* "Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite added with magnesium obtained by wet chemical precipitation". *Progress in Natural Science: Materials International* 31. 575–582. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2021.06.006>. Acesso em: 20 de setembro de 2021.

GARBO, C., LOCS, J., D'ESTE, M., *et al.* "Advanced Mg, Zn, Sr, Si Multi-Substituted Hydroxyapatites for Bone Regeneration". *Intern Journal of Nanomedicine*. Vol 15. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S226630>. Acesso em: 17 de setembro de 2021.

GENG, Z., WANG, R., LI, Z., *et al.* "Synthesis, characterization and biological evaluation of strontium/magnesium-co-substituted hydroxyapatite". *Journal of Biomaterials Applications*, v. 31, n. 1, p. 140–151. SAGE Publications Ltd. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26916949/>. Acesso em: 06 de setembro de 2021.

GHÎȚULICĂ, C. D., CUCURUZ, A., VOICU, G., *et al.* "Ceramics based on calcium phosphates substituted with magnesium ions for bone regeneration". *Int J Appl Ceram Technol.* 2019;00:1–12. 2019. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/334526464\\_Ceramics\\_based\\_on\\_calcium\\_phosphates\\_substituted\\_with\\_magnesium\\_ions\\_for\\_bone\\_regeneration](https://www.researchgate.net/publication/334526464_Ceramics_based_on_calcium_phosphates_substituted_with_magnesium_ions_for_bone_regeneration). Acesso em: 06 de setembro de 2021.

GO, E. J., KANG, E. Y., LEE, S. K. *et al.* "An osteoconductive PLGA scaffold with bioactive  $\beta$ -TCP and anti-inflammatory Mg(OH)<sub>2</sub> to improve in vivo bone regeneration". *Biomaterials Sci.* 2020. Disponível em: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1039/C9BM01864F>. Acesso em: 19 de setembro de 2021.

GU, Y., ZHANG, J., ZHANG, X. *et al.* "Three-dimensional Printed Mg-Doped  $\beta$ -TCP Bone Tissue Engineering Scaffolds: Effects of Magnesium Ion Concentration on Osteogenesis and Angiogenesis *In Vitro*". *Tissue Eng Regen Med* 16, 415–429. 2019. Disponível em: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13770-019-00192-0>. Acesso em: 17 de setembro de 2021.

GUO, X., LONG, Y., LI, W. *et al.* "Osteogenic effects of magnesium substitution in nano-structured  $\beta$ -tricalcium phosphate produced by microwave synthesis." *J Mater Sci* 54, 11197–11212. 2019. Disponível em: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10853-019-03674-7>. Acesso em: 20 de setembro de 2021.

HE, F., LU, T., FANG, X. *et al.*, "Study on Mg<sub>x</sub>Sr<sub>3-x</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> bioceramics as potential bone grafts". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* Vol 175. P. 158-165. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.085>. Acesso em: 19 de setembro de 2021.

HUANG, B., YUAN, Y., LI, T. *et al.*, "Facilitated receptor-recognition and enhanced bioactivity of bone morphogenetic protein-2 on magnesium-substituted hydroxyapatite surface". *Sci Rep* 6, 24323. 2016. Disponível em: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1038/srep24323>. Acesso em: 19 de setembro de 2021.

KE, D., TARAFDER, S., VAHABZADEH, S., *et al.* "Effects of MgO, ZnO, SrO, and SiO<sub>2</sub> in tricalcium phosphate scaffolds on in vitro gene expression and in vivo osteogenesis". *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Mar;96:10-19. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30606515/>. Acesso em: 17 de setembro de 2021.

KAZIMIERCZAK, P., KOLMAS, J., PRZEKORA, A. "Biological Response to Macroporous Chitosan-Agarose Bone Scaffolds Comprising Mg- and Zn-Doped Nano-Hydroxyapatite. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(15), 3835. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20153835>. Acesso em: 19 de setembro de 2021.

KOZUMA W, KON K, KAWAKAMI S, *et al.* "Osteoconductive potential of a hydroxyapatite fiber material with magnesium: In vitro and in vivo studies". *Dent Mater J.* 2019 Oct 2;38(5):771-778. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31257306/>. Acesso em: 19 de setembro de 2021.

LI, W., LU, Y., LIU, K. *et al.*, "Preparation of HAp whiskers with or without Mg ions and their effects on the mechanical properties and osteogenic activity of poly(D,L-lactide). *Composites Part B: Engineering.* Vol. 196, 108137. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2020.108137>. Acesso em: 19 de setembro de 2021.

LIU, X., MA, Y., CHEN, M. *et al.*, "Ba/Mg co-doped hydroxyapatite/PLGA composites enhance X-ray imaging and bone defect regeneration". *Journal of Materials Chemistry B*. 2021. Disponível em: <https://pubs-rsc-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlelanding/2021/TB/D1TB01080H#!divRelatedContent&articles>. Acesso em: 17 de setembro de 2021.

LODOSO-TORRECILLA, I., KLEIN GUNNEWIEK, R., GROSFELD, E. C., *et al.* "Bioinorganic supplementation of calcium phosphate-based bone substitutes to improve: In vivo performance: A systematic review and meta-analysis of animal studies". *Biomaterials Science*, v. 8, n. 17, p. 4792–4809. Royal Society of Chemistry. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D0BM00599A>. Acesso em: 07 de setembro de 2021.

PARRA J, GARCÍA PÁEZ IH, DE AZA AH, *et al.* "In vitro study of the proliferation and growth of human fetal osteoblasts on Mg and Si co-substituted tricalcium phosphate ceramics". *J Biomed Mater Res A*. 2017 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28426904/>. Acesso em: 07 de setembro de 2021.

SANTOS, G. G., NUNES, V. L. C., MARINHO, S. M. O. C. *et al.* "Biological behavior of magnesium-substituted hydroxyapatite during bone repair". *Braz. J. Biol.* 81 (1). 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.217769>. Acesso em: 17 de setembro de 2021.

OLIVEIRA, T. M.; BERTI, F. C. B.; GASOTO, S. C.; *et al.* Calcium Phosphate-Based Bioceramics in the Treatment of Osteosarcoma: Drug Delivery Composites and Magnetic Hyperthermia Agents. *Frontiers in Medical Technology*, v. 3, p. 26. Frontiers Media SA. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmedt.2021.700266>. Acesso em: 06 de setembro de 2021.

SHOBA, E., LAKRA, R., KIRAN, M. S., KORRAPATI, S. P. "3D nano bilayered spatially and functionally graded scaffold impregnated bromelain conjugated magnesium doped hydroxyapatite nanoparticle for periodontal regeneration". *J of the Mechanical Behavior of Biomed Materials*. Vol. 109, 103822. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103822>. Acesso em: 20 de setembro de 2021.

SINGH, S. S., ROY, A., LEE, B., KUMPTA, P. N. "Study of hMSC proliferation and differentiation on Mg and Mg-Sr containing biphasic  $\beta$ -tricalcium phosphate and amorphous calcium phosphate ceramics". *Materials Science and Engineering C*, v. 64, p. 219–228. Elsevier Ltd. 2016a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27127047/>. Acesso em: 06 de setembro de 2021.

SINGH, S. S., ROY, A., LEE, B., KUMPTA, P. N. "Synthesis, characterization, and in-vitro cytocompatibility of amorphous  $\beta$ -tri-calcium magnesium phosphate ceramics". *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. Oct 1;67:636-645. 2016b. Disponível em: [10.1016/j.msec.2016.04.076](https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.076). Acesso em: 17 de setembro de 2021.

SZURKOWSKA, K., KAZIMIERCZAK, P., KOLMAS, J. "Mg,Si—Co-Substituted Hydroxyapatite/Alginate Composite Beads Loaded with Raloxifene for Potential Use in Bone Tissue Regeneration". *Int J Mol Sci*. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7999305/>. Acesso em: 17 de setembro de 2021.

TRIPATHI, G., SUGIURA, Y., TSURU, K., ISHIKAWA, K. "In vivo stability evaluation of Mg substituted low crystallinity  $\beta$ -tricalcium phosphate granules fabricated through dissolution-precipitation reaction for bone regeneration". *Biomed. Mater.* 13 065002. 2018. Disponível em: <https://iopscience-iop.ez48.periodicos.capes.gov.br/article/10.1088/1748-605X/aad385>. Acesso em: 20 de setembro de 2021.

VELJOVICA, D., MATIC, T., STAMENIC, T. *et al.* "Mg/Cu co-substituted hydroxyapatite – Biocompatibility, mechanical properties and antimicrobial activity". *Ceramics International* 45 (2019) 22029–22039. 2019. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/334571992\\_MgCu\\_co-substituted\\_hydroxyapatite\\_-\\_Biocompatibility\\_mechanical\\_properties\\_and\\_antimicrobial\\_activity](https://www.researchgate.net/publication/334571992_MgCu_co-substituted_hydroxyapatite_-_Biocompatibility_mechanical_properties_and_antimicrobial_activity). Acesso em: 17 de setembro de 2021.

VRANCEANU, D.M., IONESCU, I.C., UNGUREANU, E., *et al.* "Magnesium Doped Hydroxyapatite-Based Coatings Obtained by Pulsed Galvanostatic Electrochemical Deposition with Adjustable Electrochemical Behavior". *Coatings*, 10, 727. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/coatings10080727>. Acesso em: 20 de setembro de 2021.

YEDEKÇI, B., TEZCANER, A.; ALSHEMARY, A. Z.; *et al.* "Synthesis and sintering of B, Sr, Mg multi-doped hydroxyapatites: Structural, mechanical and biological characterization". *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 115. Elsevier Ltd. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33307486/>. Acesso em: 06 de setembro de 2021.

ZHANG, J., TANG, L., QI, H. *et al.* "Dual Function of Magnesium in Bone Biomineralization. *Adv. Healthcare Mater.* 8, 1901030. 2019. Disponível em: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1002/adhm.201901030>. Acesso em: 19 de setembro de 2021.

WANG, M., YU, Y., DAI, K. *et al.* "Improved osteogenesis and angiogenesis of magnesium-doped calcium phosphate cement *via* macrophage immunomodulation. *Biomaterials Sci.* Issue 11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C6BM00290K>. Acesso em: 06 de setembro de 2021.

Figure\_Calibration. Disponível em: [http://www.astro.physik.uni-goettingen.de/~hessman/ImageJ/Figure\\_Calibration/](http://www.astro.physik.uni-goettingen.de/~hessman/ImageJ/Figure_Calibration/). Acesso em: 09 de setembro de 2021.

ImageJ. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Acesso em: 09 de setembro de 2021.