



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS (*P²CEM*)**

TESE DE DOUTORADO

**BIOATIVIDADE: UMA PROPRIEDADE SECUNDÁRIA EM VIDROS
BIOATIVOS DE COMPOSIÇÕES COMPLEXAS?**

LUCAS DE ARAÚJO BASTOS SANTANA

**SÃO CRISTÓVÃO – SE
MARÇO DE 2021**

LUCAS DE ARAÚJO BASTOS SANTANA

**BIOATIVIDADE: UMA PROPRIEDADE SECUNDÁRIA EM VIDROS
BIOATIVOS DE COMPOSIÇÕES COMPLEXAS?**

Orientador: Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos

**SÃO CRISTÓVÃO – SE
MARÇO DE 2021**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S232b Santana, Lucas de Araújo Bastos
Bioatividade: uma propriedade secundária em vidros bioativos de
composições complexas? / Lucas de Araújo Bastos Santana ;
orientador Euler Araujo dos Santos. - São Cristóvão, 2021.
131 f.: il.

Tese (doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Ciência dos materiais. 2. Vidros bioativos. 3. Óxido de zinco.
4. Óxido de magnésio. 5. Óxido de manganês. 6. Biocompatibilidade.
I. Santos, Euler araujo dos orient. II. Título.

CDU 66.017

BIOATIVIDADE: UMA PROPRIEDADE SECUNDÁRIA EM VIDROS BIOATIVOS
DE COMPOSIÇÕES COMPLEXAS?

LUCAS DE ARAÚJO BASTOS SANTANA

Tese submetida ao corpo docente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS da Universidade Federal de Sergipe como
parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIAS E
ENGENHARIA DE MATERIAIS.

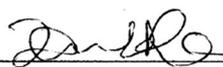
Aprovada por:



Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos



Profª. Dra. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré



Profª. Dra. Zaine Teixeira Camargo



Profª. Dra. Iara de Fatima Gimenez



Profª. Dra. Cristiane Xavier Resende

SÃO CRISTÓVÃO – SE

MARÇO DE 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, e a minha família em nome de minha mãe Cleonice de Araújo Bastos Santana, meu pai Edson Manoel de Santana e minha irmã Alessandra de Araújo Bastos Santana pelo amor, carinho e apoio durante essa jornada.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Euler Araujo dos Santos pelo exemplo de profissionalismo, competência, paciência e disponibilidade durante toda a orientação, um exemplo a ser seguido. A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (P²CEM/UFS), pelos ensinamentos transmitidos.

Agradeço a professora Dra. Débora dos Santos Tavares, pelo apoio durante a realização dos ensaios celulares.

Agradeço aos amigos de curso Mário, Paulo Henrique, Silmara e André pela convivência e ajuda na realização deste trabalho.

Agradeço aos amigos que fiz durante minha estadia em Sergipe, em especial, Rute Katiane, Vanessa, Nando, Lana, Gustavo, Mari e aos que não foram citados, mas que me proporcionaram momentos felizes, com quem quero levar para toda a vida.

Agradeço também a todo suporte laboratorial e técnico oferecido pela Universidade Federal de Sergipe (UFS), em nome dos professores, alunos, técnicos de laboratório e colaboradores que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização dos ensaios, e a Universidade de Limoges, na França pela parceria laboratorial, em nome da professora Dra. Chantal Damia.

Agradeço as agências de fomento (CAPES, CNPq e FAPITEC/SE) pelo aporte financeiro para a realização dessa pesquisa.

Por fim, agradeço todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo da Tese apresentada ao P²CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais (D.Sc.)

BIOATIVIDADE: UMA PROPRIEDADE SECUNDÁRIA EM VIDROS BIOATIVOS DE COMPOSIÇÕES COMPLEXAS?

Lucas de Araújo Bastos Santana
Março/2021

Orientador: Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

O ensaio utilizado para avaliar a bioatividade proposto por Kokubo associa a capacidade de precipitação de apatita na superfície de biomateriais imersos em fluido biológico simulado (SBF) com um melhor desempenho biológico. No entanto, existem evidências de que mesmo apresentando baixa ou nenhuma bioatividade (precipitação de apatita), alguns biomateriais tendem a estimular o comportamento de células osteoprogenitoras por vias diferentes, principalmente nas atuais biocerâmicas de composições complexas. Por exemplo, os íons bivalentes Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} são conhecidos por desempenharem importantes papéis na ativação de cascatas de sinalização associadas à regeneração óssea, ao mesmo tempo em que são conhecidos por dificultar a precipitação de apatita em certas condições. Portanto, para aprofundar a discussão sobre a validade dos ensaios de Kokubo na predição do desempenho biológico de biocerâmicas de composições complexas, foram sintetizadas cinco composições diferentes de vidros nos quais o CaO foi parcialmente substituído por ZnO, MgO e MnO: $80\%SiO_2 \cdot (16\% - x)CaO \cdot x\%MO \cdot 4\%P_2O_5$ (% em mol; $x = 0, 2$ e 6%). Os vidros foram produzidos via processo sol-gel e as suas propriedades físico-químicas foram avaliadas por análise termogravimétrica (TGA/DTG), análise térmica diferencial (DTA), fluorescência de raios X por dispersão em comprimento de onda (WDXRF), espectroscopia Raman, difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e rugosidade de superfície. O comportamento biológico das amostras foi avaliado via testes de bioatividade acelulares em SBF e testes de adesão, proliferação e diferenciação de células de osteossarcoma humano semelhantes a osteoblastos (MG-63). Por meio das análises foi possível observar que os eventos de perda de massa não sofreram alterações significativas após a substituição parcial do CaO pelos óxidos MnO, ZnO e MgO. No entanto, a adição dos óxidos reduziu a temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura de cristalização (T_c) dos vidros em função do aumento de oxigênios não ligantes (NBO). Os vidros em que o CaO foi substituído tiveram sua bioatividade prejudicada, evidenciado pela ausência de formação da camada superficial de hidroxiapatita em SBF. Porém, mesmo com a bioatividade inibida, o vidro contendo MgO foi capaz de estimular a adesão, proliferação celular e produção de ALP de células MG-63. Nos vidros contendo ZnO e MnO, a bioatividade também foi inibida, ao mesmo tempo em que uma baixa proliferação celular e alta produção de ALP foram observadas. Esses resultados demonstram claramente uma divergência entre o desempenho biológico esperado via ensaio de bioatividade e aquele realmente observado nos ensaios celulares com MG-63. Portanto, a presença de oligoelementos em biocerâmicas de composições complexas expõe cada vez mais a fragilidade dos ensaios de bioatividade na predição do seu desempenho biológico no que se refere a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas, indicando que a formação de apatita não é um critério definitivo para se confirmar sua biocompatibilidade.

Palavras-chave: vidros bioativos, ZnO, MgO, MnO, bioatividade, biocompatibilidade.

Abstract of Thesis presented to P²CEM/UFS as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Materials Science and Engineering (D.Sc.)

BIOACTIVITY: A SECONDARY PROPERTY IN BIOACTIVE GLASSES WITH COMPLEX COMPOSITIONS?

Lucas de Araújo Bastos Santana
March/2021

Advisor: Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos
Department: Materials Science and Engineering

The test used to assess the bioactivity proposed by Kokubo associates the apatite formation on biomaterials immersed in simulated body fluid (SBF) with a better biological performance. However, there is evidence that some materials tend to stimulate osteoprogenitor cells regardless of apatite precipitation, *i.e.*, in absence of bioactivity, especially in bioceramics with complex compositions. For instance, divalent ions such as Zn^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} are known to play important roles in signaling cascades associated with bone regeneration, although they are known to diminish apatite precipitation under certain conditions. To further discuss the validity of Kokubo assays in predicting the biological performance of complex composition bioceramics, five different glass compositions were synthesized in which CaO was partially replaced by ZnO, MgO and MnO: 80% SiO₂ · (16% - x) CaO · x% MO · 4% P₂O₅ (mol%; x = 0, 2 and 6%). The glasses were synthesized via the sol-gel process and their physical-chemical properties were evaluated by thermogravimetric analysis (TGA/DTG), differential thermal analysis (DTA), wavelength-dispersive X-ray fluorescence (WDXRF), Raman spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and surface roughness. The biological behavior of the glasses was studied via acellular bioactivity assay in SBF, followed by adhesion, proliferation and differentiation of osteoblast-like human osteosarcoma cells (MG-63). It was possible to observe that the mass loss events did not undergo significant changes after the partial replacement of CaO by MnO, ZnO and MgO oxides. However, the addition of oxides reduced the glass transition temperature (T_g) and the crystallization temperature (T_c) of the glasses due to the increase in non-binding oxygen (NBO). The glasses in which CaO was replaced had their bioactivity impaired, evidenced by the absence of formation of the hydroxyapatite surface layer in SBF. However, even with the inhibited bioactivity, the glass containing MgO was able to stimulate the adhesion, cell proliferation and ALP production of MG-63 cells. In glasses containing ZnO and MnO, bioactivity was also inhibited, while low cell proliferation and high production of ALP were observed. These results demonstrate a divergence between the expected biological performance suggested by Kokubo assay and the performance observed indeed from cellular assays with MG-63. Therefore, the presence of trace elements in bioceramics with complex compositions exposes even more the reliability of Kokubo assays in predicting their biological performance, notably adhesion, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells, indicating that apatite formation is not a definitive criterion to confirm biocompatibility.

Keywords: bioactive glasses, ZnO, MgO, MnO, bioactivity, biocompatibility.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	15
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
CAPÍTULO 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
3.1 VIDROS: CONCEITOS E DEFINIÇÕES.....	23
3.2 TEORIAS ESTRUTURAIS DOS VIDROS.....	25
3.3 TEORIA CINÉTICA.....	31
3.4 VIDROS BIOATIVOS.....	33
3.5 MÉTODOS DE SÍNTESE	37
3.5.1 Fusão	37
3.5.2 Rota sol-gel.....	37
CAPÍTULO 4. REVISÃO DA LITERATURA.....	41
4.1 FUNÇÃO DOS ÍONS Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} NO METABOLISMO ÓSSEO.....	42
4.1.1 Zinco.....	42
4.1.2 Magnésio.....	44
4.1.3 Manganês.....	45
4.2 OLIGOELEMENTOS METÁLICOS EM ASSOCIAÇÃO COM VIDROS BIOATIVOS.....	46
4.3 ZnO, MgO E MnO E SUAS IMPLICAÇÕES NA BIOATIVIDADE E RESPOSTA CELULAR <i>IN VITRO</i>	47
4.3 ENSAIO DE BIOATIVIDADE PROPOSTO POR KOKUBO E SUAS LIMITAÇÕES.....	50
CAPÍTULO 5. METODOLOGIA.....	53
5.1 SÍNTESE DOS VIDROS.....	54

5.1.1 Vidro padrão.....	54
5.1.2 Vidros contendo ZnO, MgO e MnO.....	55
5.1.3 Tratamento térmico do xerogel.....	55
5.1.4 Preparação das pastilhas de vidro.....	55
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS VIDROS.....	56
5.2.1 Composição.....	56
5.2.2 Comportamento térmico.....	57
5.2.3 Evolução dos grupos de silicato.....	57
5.2.4 Rugosidade da superfície.....	57
5.3 AVALIAÇÃO DA DISSOLUÇÃO E BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i>	58
5.4 COMPORTAMENTO CELULAR.....	59
5.4.1 Cultura de células.....	59
5.4.2 Adesão e proliferação celular.....	60
5.4.3 Diferenciação celular.....	61
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
CAPÍTULO 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
6.1 INFLUÊNCIA DOS ÓXIDOS NA ESTRUTURA DO VIDRO.....	63
6.2 INFLUÊNCIA DOS ÓXIDOS NA BIOATIVIDADE.....	76
6.3 INFLUÊNCIA DOS ÍONS Zn ²⁺ , Mg ²⁺ e Mn ²⁺ NO COMPORTAMENTO OSTEOBLÁSTICO.....	87
CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES.....	104
CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	106
CAPÍTULO 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de temperatura e volume para sistemas vítreos e cristalinos.....	24
Figura 2. Representação da estrutura atômica de uma (a) cerâmica cristalina A_2O_3 hipotética e de um (b) vidro amorfo A_2O_3	27
Figura 3. (a) Estrutura de um vidro e (b) representação das unidades Q^n (Q^0 , Q^1 , Q^2 , Q^3 e Q^4). Esferas amarelas representam os átomos de silício (Si), esferas vermelhas significam presença de oxigênio ligante (BO), esferas brancas oxigênio não ligante (NBO) e esferas verdes referem-se a cátions modificadores de rede (M^+).....	30
Figura 4. Diagrama TTT (tempo-temperatura-transformação) para um vidro formado por fusão, onde T_f representa a temperatura de fusão, T_n a temperatura no nariz da curva e t_n o tempo no nariz da curva.....	32
Figura 5. Sequência das etapas envolvidas na formação da camada de hidroxiapatita (HA) na superfície de vidros bioativos após exposição a fluido corporal simulado (SBF).....	36
Figura 6. Representação esquemática simplificada do processo de formação de um vidro através da síntese por sol-gel.....	38
Figura 7. Mecanismos de ação do Zn^{2+} na ativação de células osteobásticas (promove a diferenciação e mineralização celular) e inativação de células osteoclásticas (inibe a reabsorção óssea).....	43
Figura 8. Esquema representativo das etapas de síntese dos vidros, evidenciando algumas reações envolvidas e etapas de pós-processamento das amostras.....	56
Figura 9. Representação da metodologia adotada para realização do ensaio de rugosidade, onde l_1 , l_2 , l_3 e l_4 correspondem as áreas selecionadas para medição da rugosidade de superfície das pastilhas.....	58

Figura 10. Análise termogravimétrica (TGA/DTG) dos xerogéis sintetizados. Os principais eventos de perda de massa estão representados nas curvas como regiões designadas I e II.....	64
Figura 11. Análise térmica diferencial (DTA) do pó das amostras (xerogel) após secagem a 120°C. <i>a</i> e <i>b</i> representam eventos exotérmicos relacionados a cristalização e as áreas demarcadas por linhas tracejadas representam as regiões em que ocorre a T_g para cada amostra.....	65
Figura 12. Determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de cristalização (T_c) com base na análise térmica diferencial (DTA). Onde: mid point indica o ponto médio da região da T_g , T_{onset} indica o término do evento endotérmico e T_{peak} representa a temperatura de pico.....	66
Figura 13. Análise térmica diferencial (DTA) dos xerogéis sintetizados (esquerda) em associação com DRX obtida a 500, 600, 700 e 800°C (direita). Fases identificadas: ■ β -tridimita, ◆ hidroxiapatita, ° silicato de cálcio e • willemita.....	68
Figura 14. Difração de raios X com incidência rasante (GIXRD) da superfície dos vidros tratados termicamente a 700°C.....	70
Figura 15. Espectros Raman dos vidros tratados termicamente a 700°C demonstrando as bandas vibracionais de silicato.....	71
Figura 16. Representação das estruturas w_1 , D_1 e D_2 , onde w_1 refere-se às vibrações dos grupos Si–O–Si presentes em anéis com cinco ou mais unidades Q^4 , D_1 anéis com quatro unidades Q^4 e D_2 anéis com três unidades Q^4 . Esferas amarelas representam os átomos de silício (Si), esferas vermelhas significam presença de oxigênio ligante (BO).....	72
Figura 17. Deconvolução dos espectros Raman e teor relativo das unidades estruturais Q^1 , Q^2 e Q^3	73
Figura 18. Relação entre a energia de dissociação de cada sistema vítreo com seus valores de Q^1 , T_g e T_c	75

Figura 19. Imagens de MEV da superfície de BV antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF. Setas amarelas: aglomerados de fosfato de cálcio.....	77
Figura 20. Imagens de MEV da superfície de BV+Zn antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF.....	78
Figura 21. Imagens de MEV da superfície de BV+Mg antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF.....	79
Figura 22. Imagens de MEV da superfície de BV+Mn antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF.....	80
Figura 23. Imagens de MEV da superfície de BV+Zn/Mg/Mn antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF.....	81
Figura 24. Concentração molar de CaO, P ₂ O ₅ e SiO ₂ das superfícies de BV, BV+Zn, BV+Mg, BV+Mn e BV+Zn/Mg/Mn antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF, determinada por EDS.....	82
Figura 25. Difração de raios X com incidência rasante (GIXRD) da superfície dos vidros após 7 dias de imersão em SBF. Os principais planos associados a uma fase de hidroxiapatita de baixo ordenamento são descritos nos padrões GIXRD da amostra BV.....	83
Figura 26. Concentrações de íons SiO ₄ ⁴⁻ , Ca ²⁺ , PO ₄ ³⁻ , Zn ²⁺ , Mg ²⁺ e Mn ²⁺ no meio SBF antes e após a imersão das amostras de vidro por 1 e 7 dias.....	85
Figura 27. Eficácia de adesão celular <i>in vitro</i> nas amostras pelo ensaio MTT com células da linhagem MG-63 após 24 horas de incubação. *diferença significativa ($n = 5; p < 0,05$) em comparação ao grupo CTL+. **diferença significativa ($n = 5; p < 0,05$) em comparação a amostra BV.....	88
Figura 28. (a) Proliferação e (b) atividade de fosfatase alcalina de células MG-63 cultivadas sobre amostras por 7, 14 e 21 dias. *diferença significativa ($n = 3; p < 0,05$) em comparação a amostra BV. **diferença significativa ($n = 3; p < 0,05$) em comparação ao tempo experimental anterior.....	90

Figura 29. MEV das células MG-63 na superfície da amostra BV após 7, 14 e 21 dias de cultura. Setas vermelhas indicam a posição de algumas células.....	96
Figura 30. MEV das células MG-63 na superfície da amostra BV+Zn após 7, 14 e 21 dias de cultura. Setas vermelhas indicam a posição de algumas células....	97
Figura 31. MEV das células MG-63 na superfície da amostra BV+Mg após 7, 14 e 21 dias de cultura. Setas vermelhas indicam a posição de algumas células....	98
Figura 32. MEV das células MG-63 na superfície da amostra BV+Mn após 7, 14 e 21 dias de cultura. Setas vermelhas indicam a posição de algumas células....	99
Figura 33. MEV das células MG-63 na superfície da amostra BV+Zn/Mg/Mn após 7, 14 e 21 dias de cultura. Setas vermelhas indicam a posição de algumas células.....	100
Figura 34. Rugosidade média (R_a) das pastilhas de vidro tratadas termicamente a 700°C.....	102

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos cátions de acordo com a intensidade de campo (F) proposta por Dietzel.....	29
Tabela 2. Concentrações iônicas do plasma sanguíneo humano e do SBF.....	51
Tabela 3. Composição nominal dos vidros bioativos baseados no sistema $80\%SiO_2 \cdot (16\% - x)CaO \cdot x\%MO \cdot 4\%P_2O_5$ (% em mol), com diferentes concentrações de MO (MO = ZnO, MgO e MnO).....	54
Tabela 4. Composições dos vidros sintetizados medidas por WDXRF. Os valores nominais (calculados) estão expressos em negrito. Os valores obtidos experimentalmente estão representados com seus respectivos desvios padrão referentes a três sínteses independentes ($n = 3$).....	63
Tabela 5. Temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de início da cristalização (T_i) e temperaturas de cristalização (T_c) obtidas por análise térmica diferencial (DTA).....	67
Tabela 6. Valores absolutos da área sob os picos (A) utilizados para o cálculo percentual da quantidade relativa de unidades estruturais Q^1 , Q^2 e Q^3 e valores de r^2 , obtidos pela deconvolução gaussiana dos espectros de Raman utilizando o software OriginPro 2016®.....	74
Tabela 7. Resumo dos efeitos promovidos pela substituição parcial de CaO por ZnO, MgO e MnO na estrutura do vidro sobre a bioatividade, adesão, proliferação e diferenciação de células MG-63.....	102

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

Os vidros bioativos são um grupo de biomateriais de superfície reativa amplamente utilizados para a regeneração de tecido ósseo [1]. Isso se deve as suas propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, além de resposta inflamatória mínima no hospedeiro após o implante [2–4]. Sua elevada eficiência no reparo do tecido ósseo é atribuída, principalmente, à precipitação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada em sua superfície após contato com fluidos biológicos, notadamente, plasma sanguíneo. Esta camada de hidroxiapatita se forma em consequência de uma rápida sequência de reações de dissolução e precipitação que ocorrem na superfície do vidro [5, 6]. A hidroxiapatita é o principal componente inorgânico da matriz óssea, apresenta afinidade específica para adsorção de muitas proteínas estimuladoras da adesão celular, e está diretamente envolvida nos processos de diferenciação de células ósseas e biomineralização [7]. A capacidade de um vidro bioativo promover a formação de hidroxiapatita varia dependendo da sua composição e tem sido relacionada diretamente ao grau de biocompatibilidade desses biomateriais [8, 9]. Biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material estimular uma resposta biológica apropriada no hospedeiro em uma aplicação específica [10].

Um dos testes mais difundidos para se avaliar indiretamente a biocompatibilidade dos biomateriais, a exemplo dos vidros bioativos [6, 11], é o ensaio de bioatividade proposto por Kokubo [12, 13]. Este ensaio se fundamenta na medida da reatividade de superfície dos vidros quando imersos em fluidos biológicos simulados, tal como, a conhecida solução simuladora de fluido corpóreo (*simulated body fluid*, SBF). As reações começam com um processo de dissolução via hidrólise de siloxanos (Si–O–Si) de superfície gerando uma elevada quantidade de grupos silanóis (Si–OH) com densidade de carga negativa, os quais atraem íons Ca^{2+} positivos que, por conseguinte, atraem íons PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , etc, culminando na formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada com baixa cristalinidade [14]. Essa apatita se assemelha à apatita observada na biomineralização não patológica inicial do tecido ósseo [5, 15]. Tal semelhança se deve especialmente ao fato de que, após a implantação no corpo humano, vários íons, proteínas e fatores de crescimento de grande importância biológica são espontaneamente incorporados à apatita durante esse processo de precipitação.

De acordo com a teoria proposta por Kokubo [13] e revisada por diversos pesquisadores [16–18], a bioatividade de um material é proporcional à sua capacidade de formar uma camada superficial de apatita após imersão em fluido corporal simulado. As características composicionais e até morfológicas dessa apatita estimulam as células do

tecido ósseo, permitindo que o tecido se ligue diretamente a essa camada biomineralizada. Portanto, esse comportamento é considerado uma das formas mais difundidas de se prever a biocompatibilidade de um material e/ou sua capacidade de se ligar ao tecido ósseo [19]. No entanto, vários estudos sugerem que a capacidade inerente de formar uma camada de apatita após a implantação no corpo não é suficiente para definir a biocompatibilidade de um material. Outros estímulos estão igualmente envolvidos no desenvolvimento da biocompatibilidade de biomateriais: topografia [20, 21], porosidade [22–24], adsorção e liberação de íons específicos [25–28], e presença de determinadas proteínas [29, 30].

Como as soluções de Kokubo são baseadas em composições supersaturadas em relação a apatitas de cálcio, existem questões importantes sobre sua real eficiência na previsão da biocompatibilidade de um material, especialmente vidros bioativos. Através de um estudo sistemático realizado em 2006, Kokubo e Takadama [13] confirmaram a eficácia das soluções propostas anteriormente por Kokubo [12, 31] em prever a capacidade de ligação de um biomaterial ao tecido ósseo vivo. No entanto, eles também chamaram a atenção para um fato importante: essa previsibilidade é sempre efetiva desde que não exista outro componente (íons ou substâncias) na composição dos biomateriais que induza toxicidade ou reações imunes.

Em trabalho publicado recentemente, Bellucci *et al.* [32] levantaram novos questionamentos sobre a confiabilidade dos ensaios propostos por Kokubo para se prever a biocompatibilidade de um biomaterial mais complexo. Os autores demonstraram que uma alta bioatividade medida via SBF não está necessariamente associada a uma boa resposta biológica *in vitro* (biocompatibilidade) e que outros aspectos físico-químicos estão intrinsecamente envolvidos nos resultados. Essa conclusão foi alcançada após a análise dos resultados do comportamento biológico de fibroblastos de murinos frente a um compósito de vidro bioativo/hidroxiapatita por meio de ensaios diretos e indiretos. Os materiais com maior teor de vidro tiveram uma maior bioatividade no ensaio acelular, no entanto, esses mesmos materiais apresentaram piores resultados nos ensaios diretos de cultura de células, notadamente, ensaios de citotoxicidade e proliferação celular. Esse trabalho acendeu novamente o alerta sobre a eficácia dos ensaios acelulares de bioatividade (ensaios de Kokubo) para determinação da biocompatibilidade de biocerâmicas.

É muito importante considerar que vários íons liberados durante a dissolução do vidro estão presentes no meio de cultura durante um ensaio biológico. Além disso, outras moléculas orgânicas, como proteínas, citocinas e fatores de crescimento, presentes no

meio de cultura, no plasma sanguíneo durante ensaios *in vivo* ou mesmo adsorvidas na superfície dos vidros bioativos, podem afetar diretamente a resposta biológica ao material, ou seja, sua biocompatibilidade.

Atualmente, vem se demonstrando que a inclusão de oligoelementos na composição dos vidros bioativos permite o controle mais preciso do comportamento e das funções de células cultivadas sobre esses materiais [33]. Desenhos químicos adequados (em termos composicionais e de nanoestrutura) são capazes de melhorar o seu desempenho biológico, o que vem motivando a proposição de vidros de alta complexidade composicional [34]. Por exemplo, alguns íons bivalentes como o Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} , são conhecidos por desempenharem papéis importantes na ativação de cascatas de sinalização associadas à regeneração óssea por células osteoprogenitoras ou osteoblastos [33]. O Zn^{2+} está envolvido na transcrição de genes de diferenciação osteoblástica, como colágeno tipo I, fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e estímulo ao aumento da transcrição do gene Runx2 envolvido particularmente na diferenciação de osteoblastos e formação óssea [35–37]. Além disso, possui propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias [38, 39]. O Mg^{2+} promove a formação óssea ao interagir com integrinas de células osteoblásticas, responsáveis pela adesão e ancoragem celular [40, 41]. Deficiência nos níveis de Mg^{2+} no organismo causa diminuição do crescimento ósseo, aumento da reabsorção óssea e perda de osso trabecular, resultando em osteoporose [42, 43]. O Mn^{2+} participa dos processos de adesão osteoblástica via ativação de integrinas [44] e sua deficiência retarda a produção de matriz extracelular orgânica, principalmente a ossificação endocondral [45].

Vários estudos têm demonstrado que a adição de óxidos metálicos, como ZnO, MgO e MnO, em substituição ao CaO em vidros bioativos, podem alterar sua estrutura, solubilidade, estabilidade térmica e comportamento de dissolução [22, 25, 34, 46–49], afetando sua bioatividade [8, 9]. Uma questão importante que se coloca neste momento é: poderia a *biocompatibilidade* de um vidro ser aumentada pela presença de um oligoelemento sem implicações diretas em sua *bioatividade* (capacidade de formação de apatita)? Para responder essa questão, elaboramos cinco diferentes composições de vidros do sistema sílica-cal contendo fosfato conhecidos por apresentarem bioatividades distintas e incluímos diferentes oligoelementos conhecidamente envolvidos na atividade osteoblástica. Portanto, a ideia principal dessa tese de doutorado foi contrapor os efeitos da inclusão individual e simultânea de diversos oligoelementos sobre a bioatividade e comportamento osteoblástico *in vitro*, contribuindo para a discussão reaberta por Bellucci

et al. [32] para uma maior compreensão da eficácia real dos testes de bioatividade de Kokubo na previsão de biocompatibilidade.

CAPÍTULO 2
OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do teste de bioatividade proposto por Kokubo na previsão da biocompatibilidade de vidros de composições complexas, contrapondo os resultados acelulares de bioatividade com o comportamento de células osteoblásticas cultivadas sobre esses mesmos vidros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir vidros bioativos baseados no sistema $80\%SiO_2 \cdot (16\% - x)CaO \cdot x\%MO \cdot 4\%P_2O_5$ (% em mol), com diferentes concentrações de MO (MO = ZnO, MgO e MnO; $x = 0, 2$ e 6%);
- Avaliar as alterações físico-químicas provenientes da substituição parcial do CaO por ZnO, MgO e MnO nos vidros bioativos produzidos;
- Analisar o efeito dos íons Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} sobre a reatividade de superfície e formação de apatita (bioatividade) em SBF pelas amostras sintetizadas;
- Examinar o efeito do Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} sobre a adesão, proliferação e diferenciação de células de linhagem osteoblástica humana do tipo MG-63;
- Contrapor os resultados de bioatividade e comportamento osteoblástico *in vitro* para avaliação da real eficácia do teste de Kokubo na previsão de biocompatibilidade em biomateriais de composições complexas.

CAPÍTULO 3
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 VIDROS: CONCEITOS E DEFINIÇÕES

Os vidros possuem características tão peculiares que seu enquadramento em uma das três classes básicas dos materiais sólidos foi difícil. A criação de uma nova categoria, nomeada “estado vítreo”, chegou a ser cogitada, mas não houve consenso no meio científico [50]. Isso levou ao surgimento de várias definições para vidros.

Quem primeiro estudou e definiu cientificamente os vidros foi Michael Faraday em 1830. Sua definição para vidros foi de que estes eram "materiais mais semelhantes a uma solução de diferentes substâncias do que um composto em si" [51]. Lebedev [52] em 1921, tentando explicar a estrutura vítrea, propôs a hipótese do cristalito, onde os vidros foram considerados “um fundido comum consistindo de cristais altamente dispersos”. A hipótese em questão levou em consideração a analogia entre a estrutura interna e as propriedades dos vidros, mesmo antes do surgimento de técnicas mais avançadas como a difração de raios X. A hipótese do cristalito foi considerada por muitos anos como a que melhor explicava a estrutura dos materiais vítreos, porém caiu em desuso [53].

Posteriormente, algumas expressões como sólido não-cristalino, sólido amorfo e material vítreo foram empregadas como sinônimas para definir vidro. Todavia, um trabalho publicado por Gupta [54] em 1996, estabeleceu parâmetros estruturais e termodinâmicos para diferenciar cada uma dessas expressões. Em seu trabalho, Gupta demonstrou que os sólidos amorfos não apresentam relaxamento estrutural para o estado líquido, e dessa forma não apresentam o fenômeno conhecido como transição vítrea. A transição vítrea ocorre no intervalo de temperaturas em que tem início a relaxação estrutural, ocorrendo dessa forma a liberação para a movimentação das cadeias umas em relação às outras (movimento translacional). Nessa região, algumas propriedades como viscosidade, capacidade calorífica e expansão térmica começam a manifestar um comportamento diferente do padrão verificado até então. De forma resumida, um vidro pode ser definido como um sólido não-cristalino, ou seja, não possui simetria nem periodicidade translacional, e apresenta o fenômeno conhecido como transição vítrea [51, 53].

Muitas diferenças entre materiais cristalinos e vítreos podem ser observadas durante os eventos de resfriamento de um fundido. Os vários caminhos que um fundido pode percorrer ao esfriar são ilustrados no diagrama volume-temperatura (Figura 1).

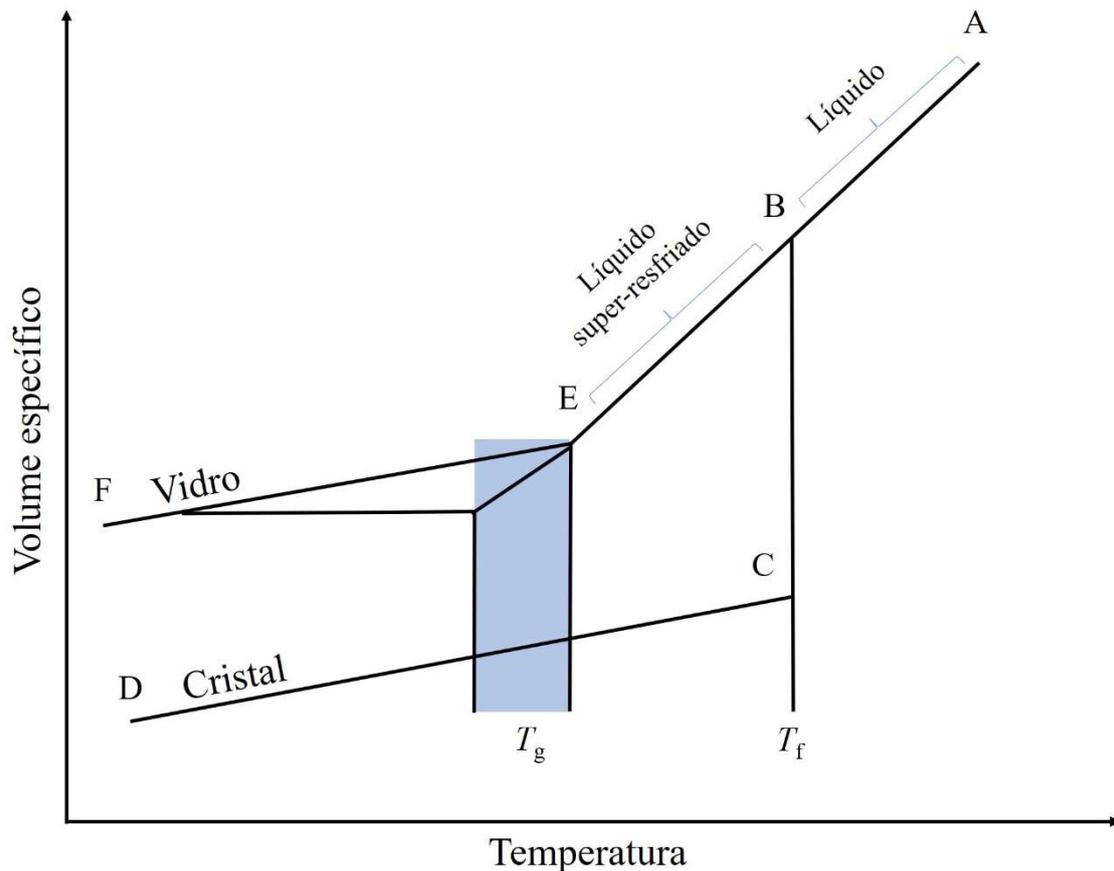


Figura 1. Diagrama de temperatura e volume específico para sistemas vítreos e cristalinos. Adaptado de [55].

O abaixamento da temperatura ocasiona um rápido aumento da viscosidade, e dessa forma os átomos ou moléculas acabam perdendo a mobilidade antes de se ordenarem. Esse fenômeno acontece em uma faixa de temperatura denominada transição vítrea (*glass transition*, T_g), que pode ser definida como o ponto de interseção das linhas extrapoladas, entre a região metaestável e a região de vidro.

Ao resfriar um líquido do estado de fusão inicial A, o volume diminuirá ao longo de AB. Nesse momento, os átomos ou moléculas se aproximam e a densidade específica do sistema aumenta, uma vez que as amplitudes vibracionais térmicas são reduzidas. O ponto B do gráfico determina se um material será cristalino ou vítreo. Se o volume específico do material sofre uma variação abrupta no ponto de fusão (T_f), indica que núcleos cristalinos foram formados, e a cristalização ocorrerá. O volume diminuirá rapidamente de B para C, e o sólido cristalino se contrairá de forma mais lenta ao longo de CD.

Para um material vítreo, conforme o fundido esfria, a viscosidade continua a aumentar e abaixo do ponto de fusão o fundido é chamado de líquido super-resfriado. Se a taxa de resfriamento for suficientemente rápida ao longo de BE, o líquido super-resfriado representará uma continuação de AB para formar um vidro. A alta viscosidade do sistema reduz quase que totalmente a movimentação das bases, impedindo que estas assumam as suas posições de menor energia, diferente do que ocorre nos sistemas cristalinos. A temperatura em que essa movimentação se torna crítica (ponto E) é exatamente o que se chama de temperatura de transição vítrea, T_g . Na região compreendida entre EF, o gráfico sofre uma mudança significativa no gradiente e o material continua se contraindo a uma taxa muito semelhante à contração da forma cristalina. Nessa região, embora o material continue com a característica estrutural de um líquido, passa a se comportar como um sólido, o conhecido estado vítreo. Propriedades como taxa de dissolução e resistência de diferentes vidros podem ser comparadas pela T_g [51]. A taxa de variação de volume diminui ao manter o vidro na T_g , e a estrutura se aproxima de um estado de equilíbrio que corresponde à menor energia livre.

Na teoria é possível falar que vidros podem ser formados de qualquer material, desde que sejam obedecidas algumas regras, como o resfriamento suficientemente rápido. Entretanto essa teoria nem sempre pode ser comprovada na prática, onde materiais com maior potencial para formar vidros devem apresentar como característica, grandes alterações de viscosidade quando submetidos a mudanças de temperatura. Dessa forma, para que um vidro possa ser formado, é necessário que exista um líquido fundido que apresente uma certa viscosidade inicial e que esta seja aumentada durante o resfriamento, e que, por último, exiba a T_g [50].

3.2 TEORIAS ESTRUTURAIS DOS VIDROS

Uma das teorias mais antigas e simples sobre a formação de vidros foi baseada em observações de Goldschmidt de que os vidros da fórmula geral A_xO_y , se formam mais facilmente quando a razão do raio iônico do cátion, R, para o íon oxigênio está na faixa 0,2 a 0,4. Uma vez que as razões de raio nesta faixa tendem a produzir cátions rodeados por quatro íons de oxigênio na forma de tetraedros, Goldschmidt acreditava que apenas os fundidos contendo cátions tetraedricamente coordenados formavam vidros durante o resfriamento. Por se tratar de uma afirmação de caráter empírico, não se apresentava

nenhuma explicação sobre o motivo da coordenação tetraédrica ser favorável à formação de vidro.

Posteriormente, Zachariasen [56] publicou um artigo onde estendeu as ideias de Goldschmidt e tentou explicar por que certos números de coordenação podem favorecer a formação de vidro, se tornou a base para os modelos mais amplamente usados sobre estrutura de vidros. A hipótese levantada por Zachariasen foi reforçada pelos experimentos de difração de raios X de Warren [57]. No artigo intitulado “The Atomic Arrangement in Glass” (O Arranjo Atômico em Vidros), Zachariasen afirmou que a base estrutural para a formação de vidros por processo de fusão/resfriamento provoca um arranjo atômico caracterizado por uma rede tridimensional estendida, com ausência de simetria e periodicidade, e que as forças interatômicas eram análogas as do cristal de mesma composição química. Ainda descreveu que a diferença entre um cristal e um vidro, estava relacionada a presença ou ausência de periodicidade e simetria em uma rede tridimensional.

Em cristais iônicos, os poliedros catiônicos geralmente compartilham os vértices. Isso é particularmente verdadeiro com cátions que têm um raio pequeno, mas uma carga alta. Para Zachariasen o compartilhamento dos vértices é crucial para obter uma estrutura aberta e aleatória. Dessa forma, se um composto hipotético de composição A_2O_3 pudesse cristalizar em duas dimensões, os arranjos atômicos no cristal e no vidro deveriam ser próximos ao observado na Figura 2. Logo, é possível observar que as formas cristalina e vítrea são compostas de triângulos AO_3 unidos entre si pelos vértices, exceto na forma vítrea, onde desordem é introduzida por mudanças nos ângulos que ligam os triângulos, ou nos ângulos definidos pelas ligações $A-O-A$, chamados de ângulos de ligação.

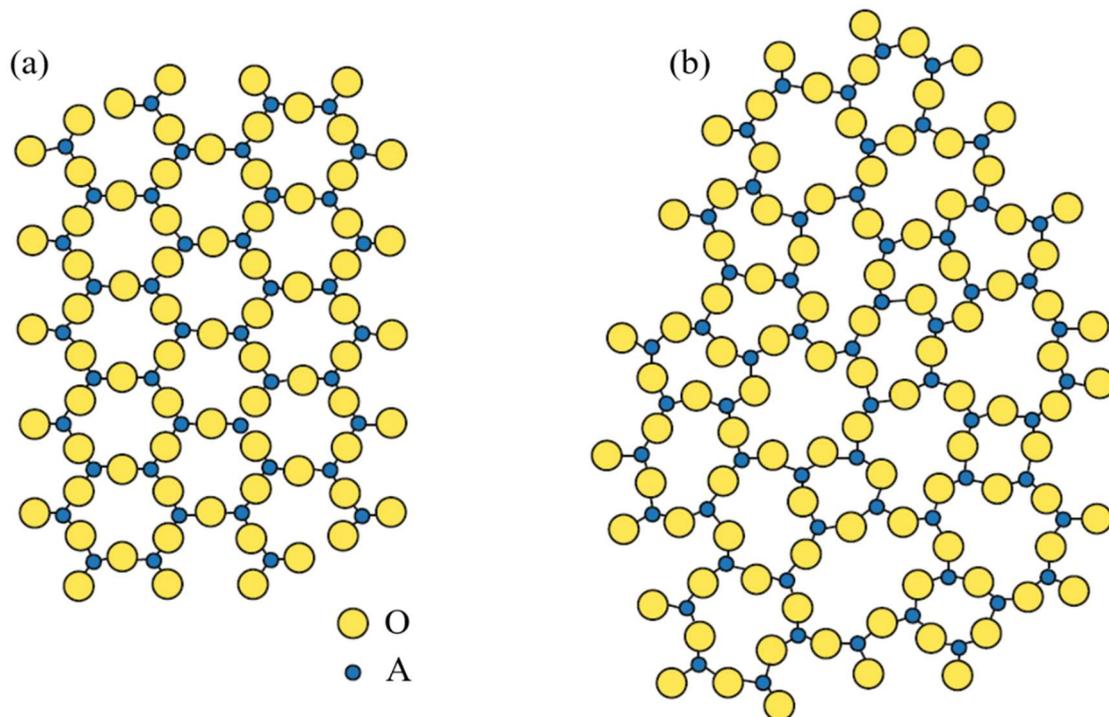


Figura 2. Representação da estrutura atômica de uma (a) cerâmica cristalina A_2O_3 hipotética e de um (b) vidro amorfo A_2O_3 [55].

A teoria da rede aleatória da estrutura vítrea proposta por Zachariasen estabeleceu algumas regras para a formação de vidro em um composto A_xO_y :

- (1) Um átomo de oxigênio está ligado a não mais do que dois átomos de A;
- (2) A coordenação do oxigênio em torno de A é pequena, digamos 3 ou 4;
- (3) Os poliedros catiônicos compartilham os vértices, não lados ou faces;
- (4) Pelo menos três vértices de cada poliedro de coordenação devem ser compartilhados.

Zachariasen também classificou os cátions presentes na estrutura do vidro como formadores de rede, modificadores de rede ou intermediários. Os formadores de rede, como Si, P, Ge, As, B, dentre outros, com um número de coordenação geralmente entre 3 e 4. Os modificadores de rede, como Ca, Na, K, Ba, dentre outros, com números de coordenação geralmente maior ou igual a 6. E os intermediários, que não podem formar um vidro por si só, mais podem reforçar a rede se apresentarem número de coordenação igual 4 ou afrouxar ainda mais a rede se tiverem números de coordenação entre 6 e 8.

Em seus estudos, Dietzel [58] incluiu a influência da força de interação entre cátions e ânions durante a solidificação de um fundido, estendendo os conceitos propostos

por Goldschmidt sobre o papel do tamanho e polarizabilidade dos íons constituintes às de suas cargas. A relação entre atração e repulsão para cátions e ânions pode ser explicada pela equação 1:

$$K = \frac{Z_c Z_a e^2}{(r_c + r_a)^2} = \frac{Z_c Z_a e^2}{a^2} \quad (1)$$

Onde K descreve a energia de atração eletrostática entre o cátion e o ânion; Z_c , Z_a são as valências do cátion e do ânion, respectivamente; e é a carga elementar; r_c , r_a são os raios de cátion e ânion, respectivamente, e $a = r_c + r_a$.

Para caracterizar o efeito de um único cátion, assumindo que o ânion é o oxigênio ($a = r_c + r_{O_2^-}$), Dietzel introduziu o termo "intensidade de campo" F , como demonstrado na equação 2:

$$F = \frac{Z_c}{a^2} \quad (2)$$

O conceito de intensidade de campo proposto por Dietzel possibilitou a elaboração de regras para o comportamento de uma massa fundida ao sofrer resfriamento que não poderiam ser explicadas apenas levando em conta as hipóteses de Zachariasen e Warren.

A classificação de elementos como formadores de rede, modificadores de rede e intermediários, segundo Zachariasen, está intrinsicamente relacionada ao conceito de intensidade de campo (F) proposto por Dietzel, onde modificadores de rede apresentam $F \approx 0,1$ a $0,4$, intermediários $F \approx 0,5$ a $1,0$ e formadores de rede $F \approx 1,4$ a 2 (Tabela 1).

Os formadores de rede são normalmente as espécies predominantes para a formação de um vidro estável, formando a espinha dorsal ou esqueleto da rede vítrea. Os óxidos SiO_2 , GeO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , P_2O_5 e V_2O_5 são alguns exemplos de formadores de rede. Seguindo as regras de Zachariasen, cada uma dessas espécies cria uma unidade estrutural localmente rígida com conectividade fornecida por átomos de oxigênios ligantes nos vértices do poliedro. A maioria dos formadores de rede pode formar vidros estáveis sem a adição de outros componentes à rede. No entanto, um exemplo de exceção a essa regra pode ser observado para o Al_2O_3 , que para formar uma rede vítrea estável requer estabilização de carga por modificadores de rede.

Tabela 1. Classificação dos cátions de acordo com a intensidade de campo (F) proposta por Dietzel [58, 59].

Função na estrutura do vidro	Elementos	Valência Z	Número de Coordenação (NC)	Raio iônico para NC = 6 (r em Å)	Distância iônica para os óxidos (a em Å)	Intensidade do campo $F = Z_c/a^2$
Modificadores de rede $F \approx 0,1$ a $0,4$	Na	1	6	0,98	2,30	0,19
	Li	1	4	0,78	2,10	0,23
	Ba	2	8	1,43	2,86	0,24
	Pb	2	6	1,32	2,74	0,27
	Sr	2	8	1,27	2,69	0,28
	Ca	2	8	1,06	2,48	0,33
	Mn	2	6	0,91	2,23	0,40
	Fe	2	6	0,83	2,15	0,43
	Mg	2	6	0,78	2,10	0,45
Intermediários $F \approx 0,5$ a $1,0$	Mg	2	4	0,78	1,96	0,53
	Fe	3	6	0,67	1,99	0,76
	Zr	4	8	0,87	2,28	0,77
	Al	3	6	0,57	1,89	0,84
	Be	2	4	0,34	1,53	0,86
	Ti	4	6	0,64	1,96	1,04
Formadores de rede $F \approx 1,4$ a 2	B	3	4	0,20	1,50	1,34
	Ge	4	4	0,44	1,66	1,45
	Si	4	4	0,39	1,60	1,57
	P	5	4	0,34	1,55	2,10
	B	3	3	0,20	-	1,63

Os modificadores de rede são componentes do sistema que alteram as características de ligação da estrutura do vidro, mas não são os formadores da espinha dorsal da rede. Em vidros de óxido, os modificadores usuais são óxidos alcalinos como o Na_2O , K_2O e Li_2O e óxidos alcalino-terrosos como o CaO , MgO , ZnO , SrO e MnO . Como o nome sugere, os elementos modificadores de rede modificam a rede vítrea, convertendo oxigênios ligantes (*bonding oxygen*, BO) em oxigênios não ligantes (*nonbonding oxygen*, NBO), reduzindo dessa forma a conectividade da rede vítrea. Quanto maior a concentração desses elementos, maior a formação de NBO [60]. Em função da ruptura das ligações de oxigênio, presença de cátions modificadores na rede vítrea produz uma série de modificações nas propriedades específicas dos vidros, tais como na viscosidade, coeficiente de expansão térmica, temperatura de transição vítrea e temperatura de fusão.

A quebra das ligações de oxigênio produz modificações estruturais na disposição das unidades tetraédricas das cadeias de silicato, e dá origem a unidades estruturais

denominadas de Q^n , onde Q representa a simetria tetraédrica da unidade SiO_4 e o n é o número de oxigênios ligantes por unidade Q para os tetraedros de silicato vizinhos [61]. Um tetraedro ligado à rede por quatro oxigênios ligantes é denominado de Q^4 , enquanto que um tetraedro sem oxigênios ligantes é denominado de Q^0 . Dessa forma, dependendo do número de oxigênios ligantes, a conectividade de rede pode estar relacionada às unidades estruturais do tipo Q^0 , Q^1 , Q^2 , Q^3 e Q^4 (Figura 3).

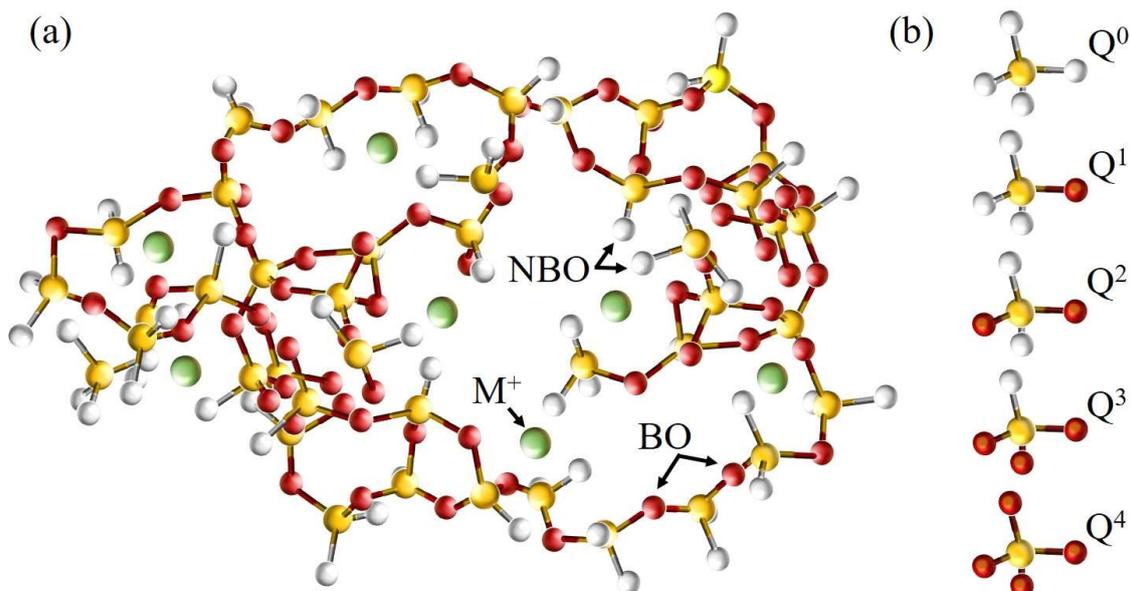


Figura 3. (a) Estrutura de um vidro e (b) representação das unidades Q^n (Q^0 , Q^1 , Q^2 , Q^3 e Q^4). Esferas amarelas representam os átomos de silício (Si), esferas vermelhas significam presença de oxigênio ligante (BO), esferas brancas oxigênio não ligante (NBO) e esferas verdes referem-se a cátions modificadores de rede (M^+).

Os formadores de rede formam poliedros catiônicos rígidos, e a ligação do cátion com o oxigênio é mais forte em comparação com os modificadores de rede. Isso demonstra que a força da ligação individual na unidade de óxido pode ser considerada como uma diferença entre os óxidos formadores de rede e modificadores de rede, porém nem sempre isso acontece [62].

Em algumas situações não é possível a classificação de determinadas espécies nem como formadores de rede nem como modificadores de rede, e por essa razão são classificados como intermediários. Isso acontece, por exemplo, para espécies que apresentam mais de um estado de oxidação, como no caso do óxido de ferro. O óxido de

ferro (II) (FeO) atua como modificador de rede, enquanto o óxido de ferro (III) (Fe₂O₃) apresenta característica de formador de rede.

3.3 TEORIA CINÉTICA

A formação de um vidro geralmente envolve o resfriamento rápido de um líquido ou vapor, de forma a evitar qualquer fração de volume detectável (10^{-6}) de cristalização [63]. As teorias mais recentes sobre a formação de vidros consideraram que qualquer material é capaz de formar um vidro, desde que seja resfriado tão rapidamente que o tempo fornecido para permitir a reorganização da estrutura no arranjo periódico exigido pela cristalização seja insuficiente. Portanto, o que se deve levar em consideração não é se um material formará um vidro, mas com que rapidez ele deve ser resfriado para evitar uma cristalização detectável [64].

A cristalização envolve dois processos, nucleação e crescimento do cristal. Nucleação é a formação de pequenos grupos de átomos ou núcleos, que ao atingirem um tamanho crítico, crescem e dão forma ao produto cristalino final. Os núcleos podem ser homogêneos ou heterogêneos. A nucleação é um processo dependente da temperatura [59, 64] e pode ser descrito pela equação 3:

$$I = A \exp[-(W + \Delta G_r)/kT] \quad (3)$$

Onde I é a taxa de nucleação homogênea, A é o fator pré-exponencial, k é a constante de Boltzmann, W é a energia de ativação para a migração de íons e ΔG_r é a energia de Gibbs associada à obtenção de um aglomerado de átomos de raio crítico, r .

Se a taxa de nucleação, I , (em s^{-1}) e a taxa de crescimento u (em $cm s^{-1}$), são conhecidas como funções de temperatura, o tempo necessário para atingir uma fração de volume cristalino de 10^{-6} pode ser representado graficamente como uma função de temperatura, conforme descrito pela equação 4:

$$10^{-6} = (\pi/3)Iu^3t^4 \quad (4)$$

O que é facilmente compreendido se for considerado que I é a frequência de nucleação no tempo t e u^3t^4 é o crescimento em três dimensões no tempo t . O gráfico assim obtido é denominado curva TTT (tempo-temperatura-transformação) ou curva de

nariz em decorrência de seu formato (Figura 4). A curva TTT é o resultado da competição entre fatores termodinâmicos e cinéticos para as taxas de nucleação e crescimento.

Conforme a temperatura se aproxima da temperatura de fusão (T_f), o tempo necessário para formar a fração de volume especificada do cristal se aproxima do infinito, uma vez que I e u se aproximam de zero. Em temperaturas muito baixas, os valores de I e u também se aproximam de zero, devido à viscosidade muito alta do fundido. O menor tempo necessário para o crescimento do cristal em qualquer temperatura é chamado de t_n (tempo no nariz da curva TTT). A temperatura que favorece a maior taxa de cristalização é chamada de T_n (temperatura no nariz da curva TTT), e representa as condições menos favoráveis para que ocorra a formação do vidro [59, 63, 64].

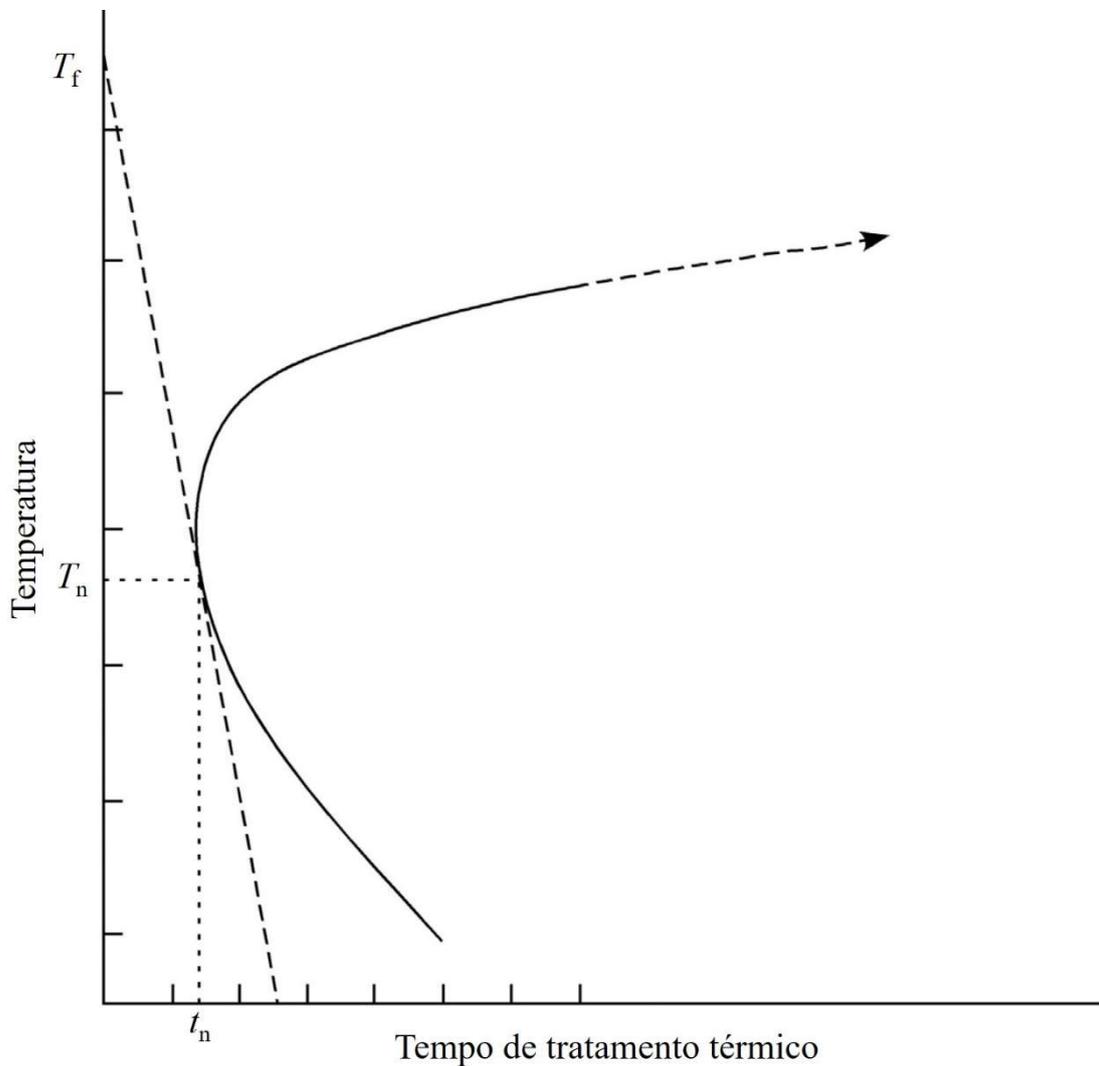


Figura 4. Diagrama TTT (tempo-temperatura-transformação) para um vidro formado por fusão, onde T_f representa a temperatura de fusão, T_n a temperatura no nariz da curva e t_n o tempo no nariz da curva [62].

A partir da curva TTT, é possível calcular a taxa de resfriamento necessária a cada temperatura para evitar uma fração de volume cristalizado acima de 10^{-6} e, portanto, formar um vidro [59]. Uma estimativa aproximada para a taxa crítica é dada pela equação 5:

$$dT/dt \approx \Delta T_n/t_n \quad (5)$$

Onde $\Delta T_n = T_1 - T_n$, para a distância da temperatura *liquidus* (T_1) e a temperatura do nariz (T_n).

Na prática, a nucleação é principalmente promovida por heterogeneidades que têm um forte efeito na taxa de resfriamento crítica [65]. Do ponto de vista prático, a influência da viscosidade na nucleação e na cinética de crescimento indica que, para a formação do vidro, (a) a alta viscosidade é vantajosa em T_1 e (b) mesmo se a viscosidade não for muito alta em T_1 , um aumento acentuado abaixo de T_1 é vantajoso. Além disso, composições próximas à eutética e composições complexas que dificultam o arranjo e o crescimento dos núcleos são frequentemente vantajosas. Geralmente, é claro, os líquidos de baixa viscosidade exigirão um resfriamento muito rápido, por exemplo, resfriamento instantâneo (10^6 K s^{-1}) ou deposição de vapor ($> 10^6 \text{ K s}^{-1}$) [59]. Vidros metálicos [66, 67], antes considerados inatingíveis, são exemplos de como é possível se controlar cineticamente o processo de cristalização de diversos materiais atualmente.

3.4 VIDROS BIOATIVOS

Os vidros bioativos são vidros de superfície reativa que apresentam alta compatibilidade biológica, biodegradabilidade e atividade osteocondutora [2, 3]. O desenvolvimento desses materiais para uso na medicina teve início na década de 1970, quando o professor Larry Hench [68] provou que alguns vidros são capazes de formar ligação interfacial com tecido ósseo. As composições que demonstraram esta propriedade foram denominadas de vidros bioativos. O termo “bioativo” refere-se a um material capaz de estimular uma resposta biológica benéfica [15].

Antes da descoberta dos vidros bioativos, os implantes projetados para reparar partes do corpo usavam materiais selecionados principalmente por sua resistência à corrosão. Porém, esses implantes eram reconhecidos como corpos estranhos pelo sistema imunológico, e acabavam sendo isolados do tecido hospedeiro por meio de

encapsulamento fibroso. O envolvimento do implante por uma cápsula de tecido fibroso dificulta a integração deste com o organismo hospedeiro, e por esse motivo muitos relatos de falhas mecânicas entre o osso e o implante foram descritos. Diferente dos materiais utilizados para enxerto ósseo até então, o vidro bioativo foi capaz de formar uma ligação química com o osso, sendo o primeiro material sintético encontrado a apresentar tal característica [69].

Os vidros bioativos são compostos principalmente pelos óxidos SiO₂, Na₂O, CaO, e P₂O₅ [70]. A primeira e mais bem estudada composição de vidro bioativo foi registrada pela Universidade da Florida com o nome Bioglass® 45S5, e contém 45% SiO₂, 24,5% Na₂O, 24,4% CaO e 6% P₂O₅ (% em peso) [68]. Desde então, diversas outras composições e sistemas de vidro bioativo já foram estudados e desenvolvidos [71].

Após serem expostos a um ambiente biológico aquoso, os vidros bioativos sofrem reações de troca iônica, hidrólise, dissolução seletiva e, por último, a precipitação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada em sua superfície, semelhante a fase mineral óssea [7]. A ligação entre os vidros bioativos e o tecido ósseo é atribuída à camada de hidroxiapatita que se forma após a dissolução da superfície do vidro e pela interação com íons liberados da superfície do vidro (por exemplo SiO₄⁴⁻, Ca²⁺ e PO₄³⁻), conhecidos por estimular a formação de tecido ósseo [15, 25].

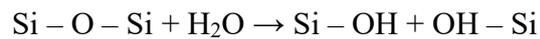
A camada de hidroxiapatita se forma após processos de dissolução do vidro após exposição a fluido corporal *in vivo* (plasma) ou fluido corporal simulado (SBF) *in vitro* (Figura 5). O acúmulo de produtos de dissolução faz com que a composição química e o pH da solução mudem, fornecendo sítios de superfície e um pH favorável à nucleação de HCA. O processo de formação da hidroxiapatita envolve uma série de reações divididas em cinco estágios [22, 71, 72].

(1) Logo após o contato com fluidos biológicos os íons Na⁺ e Ca²⁺ são liberados da superfície do vidro bioativo por troca iônica com os íons H⁺, H₃O⁺, Na⁺ e K⁺ presentes no meio, o que causa a formação de grupos hidroxila (OH⁻). Essas trocas induzem a formação de grupos silanóis (Si-OH) na superfície do vidro bioativo:

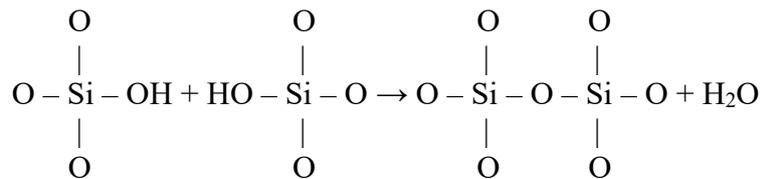


O pH da solução aumenta e uma região rica em sílica (pobre em cátions) se forma perto da superfície do vidro. O fosfato também é perdido do vidro se estiver presente na composição.

- (2) O aumento do pH local leva ao ataque da rede de vidro de sílica por OH, quebrando as ligações de silicato (Si–O–Si). A sílica solúvel é perdida na forma de Si(OH)₄ para a solução, deixando mais grupos Si–OH na interface vidro-solução:



- (3) Na sequência, ocorre a condensação de grupos Si–OH e polimerização de uma camada porosa rica em sílica (SiO₂) e pobre em íons Na⁺ e Ca²⁺ na superfície do vidro bioativo.



A hidratação subsequente dessa camada sob um pH levemente alcalino possibilita a formação de cargas negativas, as quais podem atrair facilmente íons e também moléculas orgânicas, tais como proteínas, mucopolissacarídeos e colágeno, importantes para o metabolismo ósseo [73].

- (4) A carga negativa de superfície acaba atraindo os íons Ca²⁺ positivos, os quais, por sua vez, atraem íons PO₄³⁻ negativos na superfície da camada hidratada de sílica formando um filme de fosfato de cálcio amorfo (CaO–P₂O₅).
- (5) Por fim, ocorre a cristalização do filme amorfo de CaO–P₂O₅ pela incorporação de hidroxilas (OH⁻) e carbonato (CO₃²⁻) da solução, formando uma hidroxiapatita carbonatada na superfície do material.

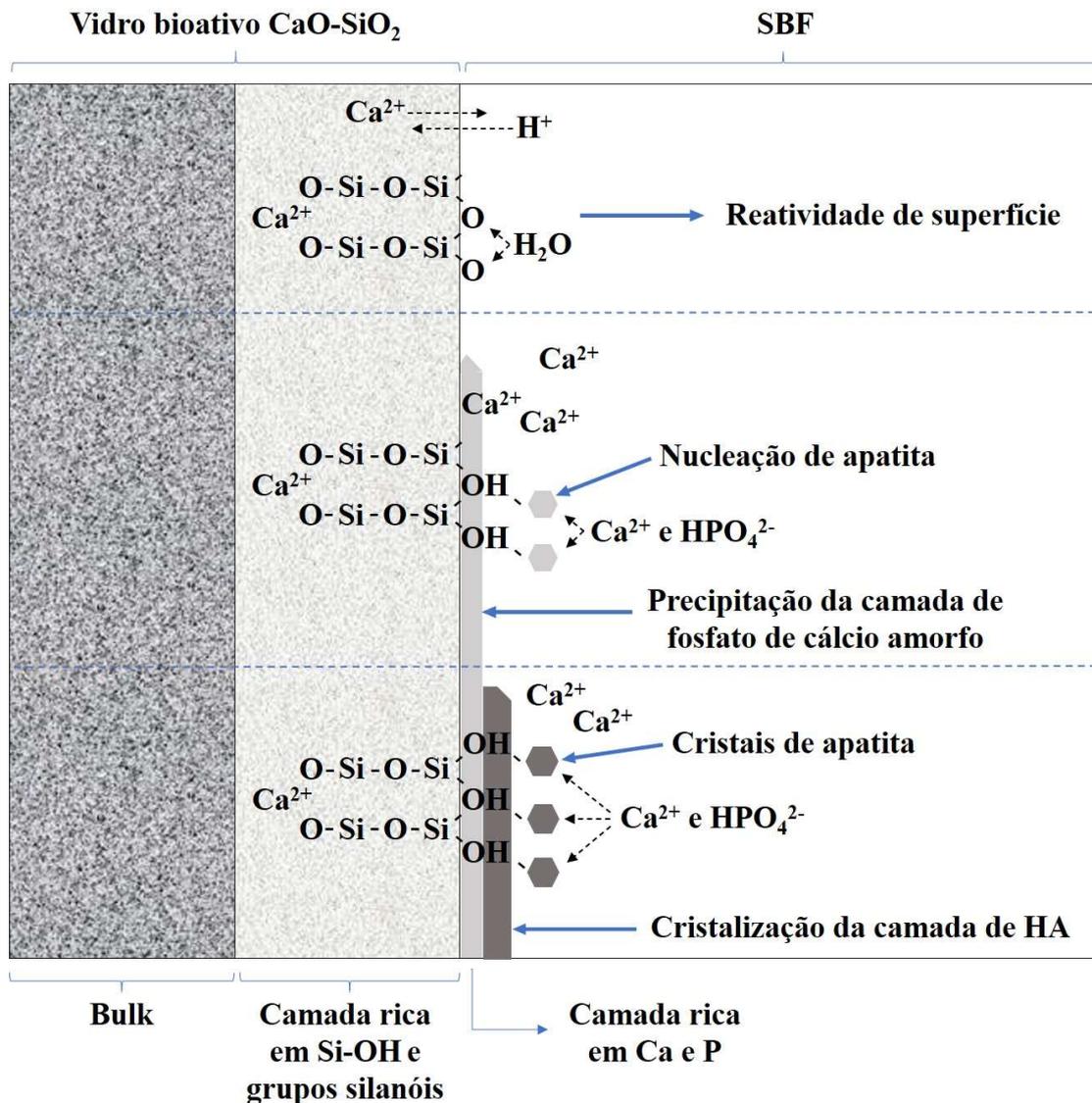


Figura 5. Sequência das etapas envolvidas na formação da camada de hidroxiapatita (HA) na superfície de vidros bioativos após exposição a fluido corporal simulado (SBF).

Quando precipitada em meio a vários elementos biológicos presentes no plasma sanguíneo, tais como, colágeno, fibronectina, proteínas plasmáticas, íons inorgânicos e uma variedade de células, incluindo as sanguíneas, fibroblastos e osteoblastos, a hidroxiapatita formada apresenta características muito próximas daquelas observadas no processo natural de mineralização óssea [74]. Acredita-se que a hidroxiapatita interage com as fibrilas de colágeno para se ligar ao osso hospedeiro [7]. A hidroxiapatita precipitada na superfície dos vidros bioativos também pode reduzir a dissolução do vidro, prevenindo que o material seja reabsorvido pelo organismo antes que a lesão seja recuperada por completo.

3.5 MÉTODOS DE SÍNTESE

3.5.1 Fusão

Os dois principais métodos de síntese utilizados para a produção de vidros bioativos são o método tradicional de fusão e o método sol-gel. Os vidros bioativos derivados da fusão são formados com métodos semelhantes aos vidros tradicionais de soda-cal-sílica [75]. Geralmente os constituintes são misturados em um moinho de bolas em meio de acetona e posteriormente calcinados a 500°C por 2 h para que substâncias voláteis sejam liberadas da composição. O pó calcinado obtido após moagem de bolas é fundido em temperaturas na faixa de 1300–1450°C dependendo da composição escolhida em forno de alta temperatura [76]. Normalmente, a fusão é feita em cadinhos de platina ou liga de platina para evitar a contaminação do fundido [77]. O fundido é então derramado em moldes para obter a forma desejada e resfriado rapidamente de modo a evitar a cristalização. Muitas vezes o vidro temperado é recozido a 500°C para remoção das tensões internas [78].

Os processos de pesagem, mistura, fusão, homogeneização e formação do vidro devem ser feitos sem a introdução de impurezas ou perda de constituintes óxidos de baixa temperatura de vaporização, como Na₂O ou P₂O₅. Conforme se aumenta o teor de SiO₂ da composição do vidro, a temperatura de fusão tende a aumentar e a homogeneização dos constituintes começa a ser afetada, pois a mistura se torna mais viscosa. Os vidros obtidos por fusão geralmente são densos [71].

3.5.2 Rota sol-gel

O sol-gel apresenta como característica a formação e união de nanopartículas de sílica amorfa em temperatura ambiente. A Figura 6 apresenta um esquema simplificado da formação de um vidro através do processo sol-gel. A síntese por sol-gel tem início por meio da mistura das soluções precursoras em temperatura ambiente. Nessa etapa ocorre a hidrólise e condensação para a formação da solução conhecida como sol. Posteriormente vem a etapa de gelificação e formação do gel. O gel formado pela aglomeração das partículas precursoras passa por envelhecimento para fortalecimento da rede e posterior secagem. Durante a secagem ocorre a evaporação de subprodutos da reação (por

exemplo, água e álcool). Por último tem a etapa de estabilização (remoção de nitratos e silanóis) [22].

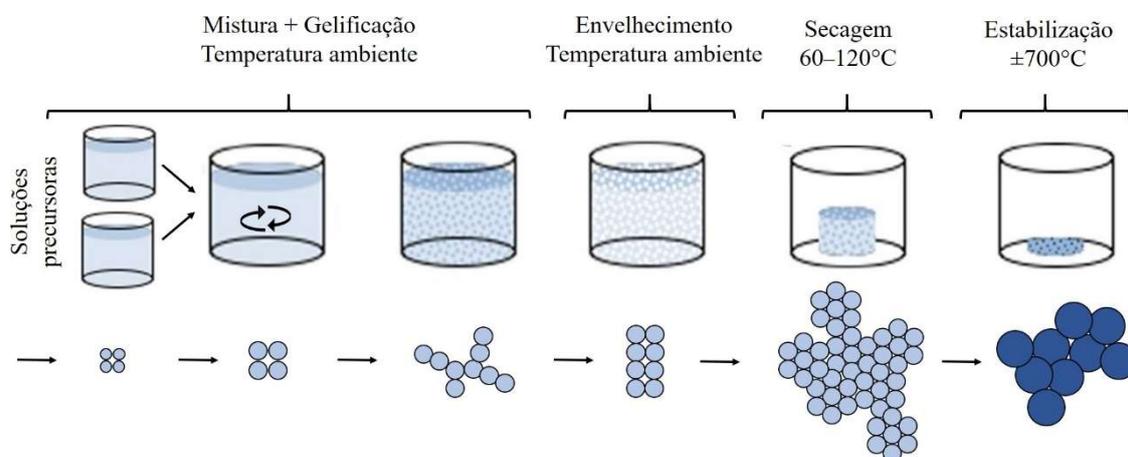
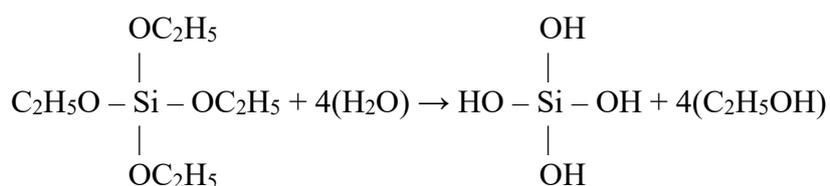


Figura 6. Representação esquemática simplificada do processo de formação de um vidro através da síntese por sol-gel.

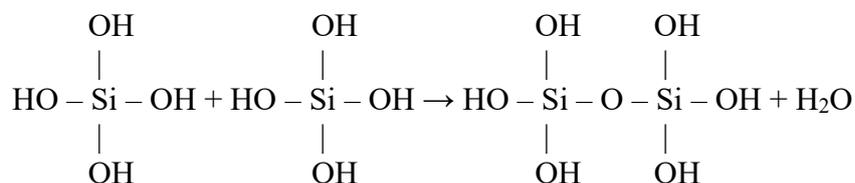
Os precursores para a produção de vidros à base de silicato são geralmente alcóxidos ($\text{Si}(\text{OR})_4$, onde R pode ser CH_3 , C_2H_5 ou C_3H_7) e nitratos. Os alcóxidos são normalmente usados como precursores dos formadores de rede, como sílica e fosfato, enquanto os sais (por exemplo, nitratos) são normalmente usados para introduzir modificadores de rede, como cálcio [22].

A solução conhecida como sol é uma dispersão de partículas coloidais (com diâmetros de 1–100 nm) em um líquido, criada pela hidrólise dos precursores. A combinação e as quantidades dos precursores misturados com água para criar o sol irão determinar a composição do vidro. Por ser insolúvel em água, o tetraetilortosilicato ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, TEOS) necessita de um catalisador para desencadear a hidrólise dos tetraedros de sílica [79].



O catalisador pode ser um ácido ou uma base, e isso afetará as propriedades finais do vidro. Os tetraedros têm superfícies de grupos $\text{Si}-\text{OH}$ e estão em meio aquoso. Em $\text{pH} < 2$, usando um catalisador como o ácido nítrico (HNO_3), os tetraedros irão se unir e os

grupos Si–OH se condensarão, formando ligações do tipo O–Si–O, tendo a água como um subproduto da reação [79].



As reações de hidrólise e policondensação ocorrem simultaneamente dentro da solução durante a mistura. Quando um número suficiente de ligações Si–O–Si interconectadas são formadas em uma região, elas se comportam como partículas coloidais submicrométricas e um sol é formado. As primeiras partículas pequenas que se formam são chamadas de "partículas primárias" [22, 79].

Antes de sofrer o processo de gelificação, a solução sol é armazenada em moldes de material antiaderente. Dependendo da composição, o processo de gelificação pode levar vários dias em temperatura ambiente. Conforme o tempo vai passando, a aglomeração das partículas primárias vai ocorrendo. À medida que mais e mais partículas se unem, uma rede de ligações O–Si–O começa a se formar e a viscosidade do sol aumenta, até que uma rede de sílica rígida seja formada. Nesse momento o sol se transforma em um gel, e a reação continua até que todo o precursor seja consumido [22].

Após a gelificação vem o processo de envelhecimento do gel. Esse processo pode levar várias horas ou dias, e pode ocorrer em temperatura ambiente ou a temperaturas ligeiramente mais elevadas, como por exemplo a 60°C. O envelhecimento tem por finalidade fortalecer a rede do gel conforme a reação de condensação continua. Sem o estágio de envelhecimento, o gel tende a quebrar durante a secagem [22].

Depois de envelhecido, o gel passa para a etapa de secagem para a remoção dos subprodutos da reação de condensação. Nessa etapa o gel é aquecido em temperaturas crescentes, que podem variar de 60 a 120°C. Conforme a água e o álcool evaporam, eles deixam uma rede de poros nanométricos interconectados (1 a 30 nm de diâmetro) [22].

Embora o processo de secagem remova a água, grupos hidroxila (OH) são deixados nas paredes dos poros. Um sólido poroso quimicamente estável pode ser obtido removendo as ligações de silanol de superfície (Si–OH) da rede de poros, geralmente por tratamento térmico. O tratamento térmico elimina os grupos –OH, originando a formação de mais ligações O–Si–O. Se outros precursores, como nitratos, tiverem sido usados no

processo, por exemplo nitrato de cálcio para introduzir cálcio na composição, os nitratos também serão removidos durante a estabilização. O método usual é aquecer o gel seco a temperaturas acima de 600°C [22, 71]. A temperatura de estabilização varia conforme a composição do material, e deve ser avaliada com cuidado afim de evitar a cristalização.

O método sol-gel surge como alternativa, apresentando vantagens em comparação ao método de fusão e solidificação, produzindo materiais com maior grau de pureza e homogeneidade, e com possibilidade de utilizar uma variada gama de composições [80, 81]. A nanoporosidade e a maior área de superfície dos vidros derivados de sol-gel fornecem melhores respostas celulares quando comparados a vidros produzidos por fusão com mesma composição, uma vez que a bioatividade desses materiais está associada a reações que acontecem em sua superfície [8, 9, 22]. Além disso, a metodologia sol-gel apresenta grande versatilidade, permitindo a preparação de vidros bioativos com diferentes composições, tamanhos e morfologias, além de permitir a incorporação de elementos com atividades fisiológicas e propriedades terapêuticas em sua rede vítrea [82–85]. A temperatura de processamento relativamente baixa, normalmente entre 500°C e 700°C, é benéfica na supressão da desvitrificação e perda de peso durante a sinterização [86].

CAPÍTULO 4
REVISÃO DA LITERATURA

4.1 FUNÇÃO DOS ÍONS Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} NO METABOLISMO ÓSSEO

A remodelação óssea é gerida por uma enorme variedade de agentes moleculares reguladores sistêmicos e locais, incluindo fatores de crescimento e hormônios. Além desses, alguns íons inorgânicos são conhecidos por estarem envolvidos no metabolismo ósseo, além de participarem dos processos de angiogênese, crescimento e mineralização do tecido ósseo. Em particular, os íons Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} atuam como cofatores enzimáticos, na transdução de sinais e estimulam efeitos metabólicos necessários para a formação e manutenção de alguns tecidos, dentre eles o osso [35].

4.1.1 Zinco

O Zn^{2+} é um oligoelemento necessário para muitos processos catalíticos, estruturais e regulatórios celulares [87]. Esse elemento demonstrou ser fundamental para o crescimento, desenvolvimento e diferenciação de células ósseas, tanto *in vivo* como *in vitro* [88, 89]. O Zn^{2+} estimula a síntese de proteínas e é cofator para muitas enzimas, como a fosfatase alcalina (*alkaline phosphatase*, ALP), uma enzima expressa nas células de vários tecidos do corpo, especialmente naqueles mineralizados, sendo de grande importância para a mineralização da matriz óssea [90]. A ALP aumenta as taxas locais de fosfato inorgânico e facilita a mineralização, bem como reduz a concentração de pirofosfato extracelular, um inibidor da mineralização da matriz óssea. A mineralização pode ser compreendida como a produção, no interior das vesículas da matriz, de cristais de hidroxiapatita que brotam da membrana externa de osteoblastos hipertróficos e condrócitos. Durante o processo de mineralização pode ser observado o acúmulo da hidroxiapatita se formar na matriz extracelular entre as fibrilas de colágeno [91]. Os níveis de ALP esquelético são regulados pelo fosfato inorgânico, que atua evitando a dissociação do centro ativo de Zn^{2+} da molécula de ALP. Ao evitar a dissociação do centro ativo de Zn^{2+} , o fosfato inorgânico aumenta o tempo de meia-vida da molécula de ALP esquelética [90].

A nível celular, o Zn^{2+} atua promovendo a diferenciação e mineralização celular (osteoblastos), e inibindo a reabsorção óssea (osteoclastos) (Figura 7). Esse efeito pode ser explicado pelo fato do Zn^{2+} agir como um potente antagonista da ativação do NF- κ B (*nuclear factor kappa B*). A ativação do NF- κ B pode ser mediada pelo TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*), potente citocina pró-inflamatória que estimula a reabsorção óssea

e diminui a formação óssea *in vitro* e *in vivo*. Nas células osteoclásticas o NF-κB atua na sinalização de reabsorção óssea, e nas células osteoblásticas o NF-κB atua inibindo a diferenciação e mineralização celular. O Zn^{2+} também atua inibindo a atividade de TNF- α sobre TGF β (*transforming growth factor* β) e BMP-2 (*bone morphogenetic protein*), ambas citocinas que desempenham papel importante na diferenciação e recrutamento de osteoblastos para locais de remodelação óssea, e responsáveis pela ativação da expressão do complexo Smad, importante na diferenciação osteoblástica.

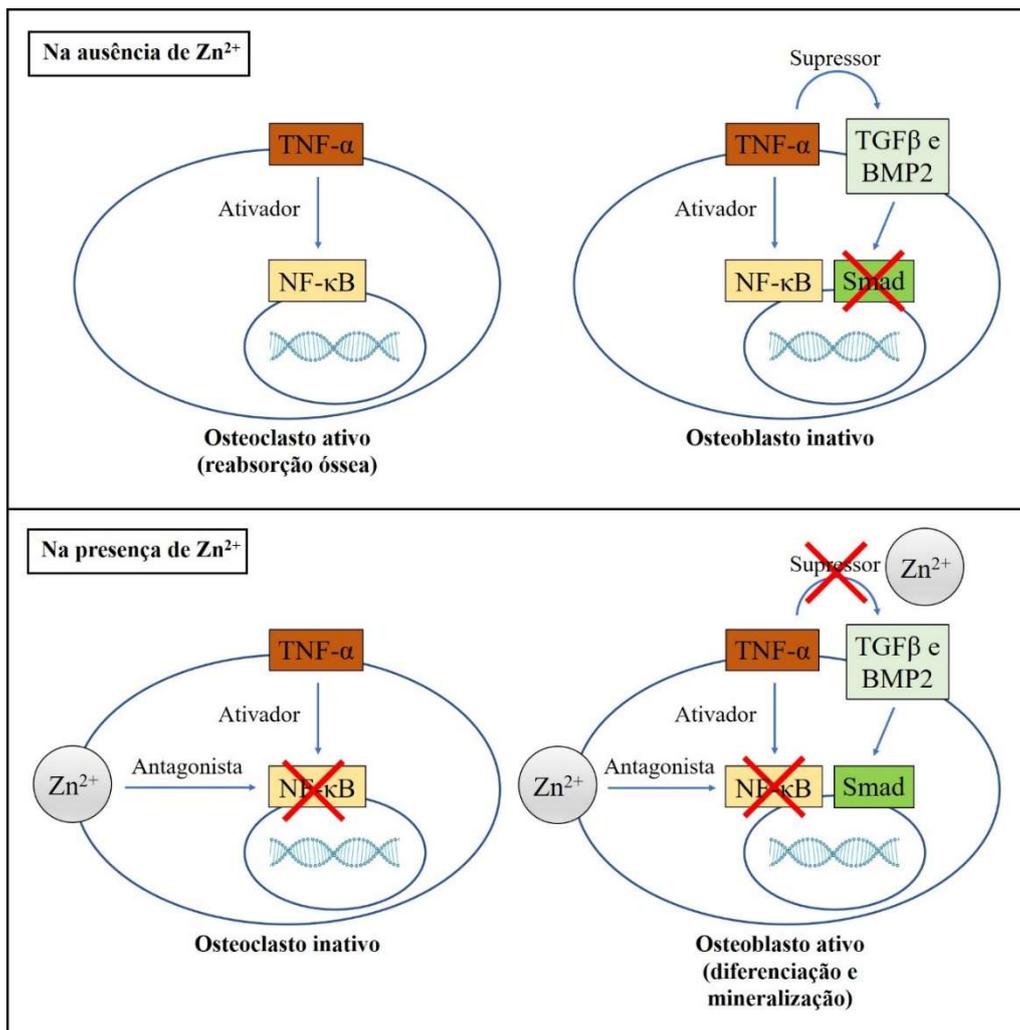


Figura 7. Mecanismos de ação do Zn^{2+} na ativação de células osteobásticas (promove a diferenciação e mineralização celular) e inativação de células osteoclásticas (inibe a reabsorção óssea).

O efeito antagonista sobre a ativação do NF- κ B e a supressão da atividade do TNF α sobre TGF β e BMP-2 são responsáveis pelo efeito anti-inflamatório e osteoprotetor

do Zn^{2+} sobre as células ósseas [92]. O Zn^{2+} também atua em vias de sinalização envolvidas na apoptose de células osteoclásticas [93].

O Zn^{2+} pode potencializar a osteogênese através da indução da síntese de colágeno, atividade de ALP e mineralização de nódulos ósseos [36]. Em estudo com células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1, o Zn^{2+} demonstrou estar atrelado a expressão de Runx2, principal gene responsável pela osteogênese [92]. Em células-tronco mesenquimais, o Zn^{2+} está envolvido na sinalização de proteínas quinases 1 e 2 (ERK1/2) conhecidas por mediar a proliferação celular e a apoptose [94, 95].

Estudos também apontam que o Zn^{2+} apresenta propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias, causando disfunção proteica e estresse oxidativo, através da produção de espécies reativas de oxigênio e depleção de reservas antioxidantes dentro das células microbianas [38, 96]. A deficiência de Zn^{2+} pode acarretar retardo do crescimento esquelético e alterações na calcificação do tecido ósseo [17].

4.1.2 Magnésio

O Mg^{2+} está presente de forma natural no corpo humano e é essencial em muitos processos metabólicos. Os íons Mg^{2+} estão envolvidos na síntese de proteínas, lipídios, sendo cofatores para muitas enzimas e tendo importância relevante na estabilização das estruturas de DNA (*deoxyribonucleic acid*) e RNA (*ribonucleic acid*) [97, 98]. O Mg^{2+} pode se ligar ao trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate*, ATP) para formar o complexo Mg-ATP. Esse complexo funciona como fonte de energia primária e é indispensável para muitas funções fisiológicas, incluindo condução nervosa, contração muscular e regulação da pressão arterial [99]. O Mg^{2+} é um dos minerais mais importantes da matriz óssea, sendo encontrado em baixas concentrações no esmalte dentário, dentina e osso [11]. Uma parte do Mg^{2+} presente no osso está associado como parte integrante da rede de hidroxiapatita da matriz óssea inorgânica, e outra parte está ligado à superfície celular, de forma a facilitar as trocas iônicas necessárias para a manutenção da homeostase [100]. O Mg^{2+} também interage diretamente com as integrinas das células osteoblásticas, uma família de receptores que promove interações da superfície celular com a matriz extracelular, auxiliando nos processos de adesão e estabilidade celular [101].

Alguns estudos mostraram uma correlação entre deficiência de Mg^{2+} e osteoporose [33, 98, 102]. O mecanismo pelo qual uma redução dos níveis séricos de

Mg^{2+} acentua a osteoporose ainda não foi elucidado, mas provavelmente isso acontece por múltiplos fatores. Como a bomba de H^+/K^+ -ATPase nas células do periósteo e do endósteo são dependentes de Mg^{2+} , o pH do fluido extracelular ósseo pode diminuir na deficiência desse íon, resultando em desmineralização [103]. Além disso, a formação de 1,25 dihidroxivitamina D envolve uma enzima hidroxilase dependente de magnésio, e as concentrações séricas de 1,25 dihidroxivitamina D mostraram ser mais baixas na deficiência de Mg^{2+} [104]. Alterações nos níveis de hormônio paratireoide, e/ou aumento na reabsorção óssea resultante de uma maior produção de substância P, TNF- α , IL-1 β e RANKL, e diminuição da osteoprotegerina também podem estar envolvidos nesse mecanismo [42].

4.1.3 Manganês

O Mn^{2+} é reconhecido por desempenhar um papel significativo no metabolismo dos músculos e ossos. Esse íon atua como ativador enzimático e como um componente de metaloenzimas, desempenhando um papel importante na fosforilação oxidativa, no metabolismo dos ácidos graxos e do colesterol, no metabolismo dos mucopolissacarídeos e no ciclo da ureia [105]. O Mn^{2+} apresenta grande correlação como a remodelação da matriz extracelular [106] e a mineralização óssea [107]. Alguns estudos propuseram que o Mn^{2+} estimula a adesão celular por meio da ativação de integrinas, controlando a afinidade de ligação ao ligante e a avidéz do *cluster* receptor [106, 108, 109].

O Mn^{2+} está presente em pequenas quantidades em vários tecidos e órgãos, como osso (cerca de 2 ppm), hipófise, pâncreas, fígado e mucosa intestinal. O Mn^{2+} é um cofator de enzimas essenciais para as funções celulares, como superóxido dismutase, RNA polimerase, piruvato carboxilase e arginase [26]. O Mn^{2+} também está envolvido no remodelamento das fibras de colágeno do tecido ósseo, que ao serem degradadas liberam seus constituintes essenciais, como a prolidase, uma metaloprotease que possui um sítio específico para o Mn^{2+} [110]. Além disso, foi demonstrado que o Mn^{2+} participa da manutenção da massa óssea, apresentando níveis reduzidos em pacientes com osteoporose [111].

4.2 OLIGOELEMENTOS METÁLICOS EM ASSOCIAÇÃO COM VIDROS BIOATIVOS

Com o avanço dos estudos sobre vidros bioativos, novas propostas de materiais capazes de controlar a atividade celular, proporcionando um reparo do tecido lesado de forma mais eficaz, foram surgindo [112–114]. Algumas propostas visam a associação de proteínas e fatores de crescimento com vidros bioativos, com o intuito de induzir respostas celulares específicas, como estimular a osteogênese, angiogênese e efeitos antibacterianos. Entretanto, a associação dessas moléculas com vidros bioativos não é algo simples, tendo em vista o alto custo associado e, principalmente, pela dificuldade em se evitar a desnaturação durante a manipulação ou estabilização no *bulk* ou na superfície dos vidros [6, 25, 114–117].

Em alternativa às proteínas e fatores de crescimento, pesquisas recentes passaram a propor o uso de oligoelementos metálicos como o Zn, Mg, Mn, Sr, B, Fe e Li em associação aos vidros bioativos. Esses oligoelementos, presentes de forma natural no organismo, podem atuar nas células induzindo respostas biológicas análogas as proteínas ou fatores de crescimento, além de apresentarem uma maior facilidade de manipulação e custo reduzido [25, 45].

Uma das vias mais utilizada para a inclusão desses elementos metálicos na composição de vidros bioativos é pela substituição de certa quantidade do óxido de cálcio (CaO) presente na composição padrão do vidro pelo óxido metálico de interesse, durante o processo de síntese. Por meio dos processos de dissolução que acontecem na superfície dos vidros bioativos após estes serem expostos aos fluidos corporais, os elementos metálicos presentes na composição são liberados em sua forma iônica (por exemplo os íons Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , B^{2+} , Fe^{2+} e Li^{2+}) diretamente no local onde são necessários, para assim desempenharem seu papel sobre as células [118].

Estudos apontam que os óxidos metálicos em associação com vidros bioativos podem intervir na atividade celular por vias distintas. Uma dessas vias diz respeito a influência da adição dos óxidos na reatividade de superfície dos vidros bioativos e, conseqüentemente, na dissolução do mesmo. Isso acontece porque tais óxidos são considerados intermediários ou formadores de rede, o que acaba ocasionando modificações na rede vítrea composta pelas cadeias tetraédricas de SiO_4^{4-} e PO_4^{3-} , interferindo na formação da camada superficial de hidroxiapatita. A literatura também descreve que a adição de cátions específicos dentro da matriz vítrea pode alterar outras

propriedades, como a microestrutura e o comportamento térmico. Portanto, as propriedades dos vidros bioativos podem variar dependendo dos metais usados e concentração dos mesmos [33]. Outra via de estudo, já mencionada, aponta os efeitos da liberação dos elementos metálicos em sua forma iônica diretamente sobre as células durante as etapas de dissolução do material [34].

4.3 ZnO, MgO E MnO E SUAS IMPLICAÇÕES NA BIOATIVIDADE E RESPOSTA CELULAR *IN VITRO*

O potencial osteogênico de vidros bioativos com adição de ZnO já foi alvo de diversos estudos [16, 119–122]. Oki *et al.* [120] demonstraram que vidros bioativos de composição equivalente a 64% SiO₂, 26% CaO, 5% ZnO, e 5% P₂O₅ (% em mol), apresentaram bioatividade e estimularam a proliferação e aumento da atividade de ALP em células osteoblásticas cultivadas sobre sua superfície. Entretanto, resultado oposto foi observado por Lusvardi *et al.* [119], onde a adição de ZnO ($\geq 8\%$ em mol) em vidros bioativos de composição 46,2% SiO₂, 26,9% CaO, 24,325 Na₂O, e 2,6% P₂O₅ produziu efeito negativo na formação da camada superficial de hidroxiapatita e reduziu a atividade celular em termos de adesão, proliferação e diferenciação em células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1. Para Haimi *et al.* [121] a presença de ZnO interfere no perfil de degradação de vidros bioativos, reduzindo sua bioatividade, e esse efeito é dependente da sua concentração. Também já foi demonstrado que a adição de ZnO em vidros bioativos atrasa o início da nucleação de hidroxiapatita após imersão em SBF [123].

A citotoxicidade de vidros bioativos contendo ZnO já foi avaliada em relação a concentração usada [124, 125]. Foi evidenciado que concentrações de Zn²⁺ na faixa de 2 a 8 ppm podem causar danos em osteoblastos humanos via estresse oxidativo [125]. Aina *et al.* [124] produziram vidros bioativos de composição 45SiO₂–24,5Na₂O–24,5CaO–6P₂O₅ (% em peso) com a adição de 5 e 20% em peso de ZnO em substituição ao CaO. Eles observaram que o vidro bioativo com 5% de ZnO aumentou a adesão e proliferação celular em relação ao controle, enquanto que o vidro bioativo com 20% de ZnO aumentou a adesão de células endoteliais, mas diminuiu sua taxa de proliferação. Nesse estudo, a concentração de Zn²⁺ liberado no meio de cultura pelo vidro bioativo com 5% em peso de ZnO foi igual 1,1 ppm e no vidro bioativo com 20% em peso de ZnO foi de 2,7 ppm, essa última considerada tóxica para as células.

Em seus estudos, Balamurugan *et al.* [16] produziram um vidro bioativo do sistema CaO–P₂O₅–SiO₂–ZnO pela técnica sol-gel, e os resultados demonstraram que a incorporação de 5% em mol de ZnO em substituição ao CaO não diminuiu sua bioatividade. Esse estudo também avaliou a biocompatibilidade *in vitro*, e ficou demonstrado que a substituição de CaO por quantidades limitadas de ZnO no sistema de vidro bioativo estimulou a proliferação celular precoce e promoveu a diferenciação. A bioatividade e biocompatibilidade de vidros bioativos com adição de ZnO não estão relacionadas apenas à capacidade de formação de apatita, mas também à liberação de Zn²⁺, íon conhecido por estimular a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas [123].

Estudos demonstram que adição de MgO em sistemas vítreos, podem elevar a reatividade da superfície do material pelo aumento da razão MgO/CaO, e dessa forma desempenhar um papel importante na bioatividade do vidro. Por outro lado, em alguns estudos *in vitro* foi visto que o MgO pode ter efeito prejudicial na formação de apatita [126, 127]. Al-Noaman *et al.* [126] produziram vidros bioativos contendo SiO₂, CaO, MgO, ZnO, Na₂O, K₂O e P₂O₅ com diferentes concentrações de MgO. Eles observaram que o MgO não inibe a formação de apatita, mas diminui a taxa de degradação do vidro gradualmente com o aumento nos níveis, retardando a nucleação e crescimento da apatita. Porém, mesmo interferindo na formação da hidroxiapatita os vidros bioativos contendo MgO exibiram um ambiente biocompatível para fibroblastos humanos. Também já foi demonstrado que a taxa de formação da camada de apatita diminui quando o teor de MgO está em uma concentração molar acima de 7% [128].

Varanasi *et al.* [129] demonstraram um aumento de marcadores de diferenciação celular e atividade osteogênica (ALP, colágeno tipo I, Runx2 e osteocalcina) em células cultivadas em meio de cultura condicionado com produtos de dissolução de vidros bioativos contendo MgO. Entretanto, o aprimoramento da resposta biológica não foi claramente atribuído ao efeito do íon Mg²⁺. Da mesma forma, outros trabalhos onde MgO foi adicionado na composição de vidros bioativos, obtiveram como resultado um aumento da proliferação e diferenciação de osteoblastos [130, 131], da atividade de ALP em células osteoblásticas fetais humanas [132] e da expressão de marcadores osteogênicos em células derivadas de ossos humanos [133], mas a falta de um material controle sem a presença de MgO, nesses estudos, gera dúvidas quanto ao real efeito do Mg²⁺. Brauer *et al.* [134] produziram vidros bioativos do sistema P₂O₅–CaO–Na₂O–MgO e testaram se a biocompatibilidade estava relacionada à taxa de dissolução. Para a realização dos ensaios

foram utilizadas células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1 e os tempos de cultivo foram de 24 e 72 h. Os resultados demonstraram que os materiais contendo MgO apresentaram uma menor taxa de dissolução e induziram um aumento significativo da proliferação celular.

Vários estudos *in vitro* revelaram que a adição de MgO em vidros bioativos favorece a adesão celular, a proliferação e a diferenciação das células osteoblásticas em comparação às amostras de controle [135, 136]. Mesmo que o magnésio reduza o crescimento de cristais de apatita, ainda pode ser considerado benéfico pois é cofator para várias enzimas relacionadas à saúde óssea. Além disso, a bioatividade do MgO em algumas vitrocerâmicas da Bioverit já foi clinicamente confirmada [137].

Vidros bioativos com adição de MnO já foram alvos de alguns estudos. Em um trabalho realizado por Barrioni *et al.* [138] foram produzidos vidros bioativos com sistema CaO–P₂O₅–SiO₂–MnO, pela técnica sol-gel, e os resultados demonstraram que a incorporação de até 5 mol% de MnO em substituição ao CaO não alterou sua bioatividade *in vitro*. Além disso, os ensaios de citotoxicidade mostraram que os produtos iônicos provenientes de diferentes concentrações do vidro contendo MnO geraram um ambiente favorável ao desenvolvimento de células osteoblásticas, com preservação da morfologia e proliferação celular semelhante aos controles sem a presença de MnO.

Miola *et al.* [26] propuseram vidros derivados de fusão com diferentes quantidades de MnO, e seus resultados demonstraram uma potencial melhora no crescimento e atividade osteogênica de osteoblastos *in vitro*. Barrioni *et al.* [139] mostraram que os produtos iônicos de diferentes concentrações de vidros bioativos do sistema SiO₂–P₂O₅–CaO–MnO gerou um ambiente favorável ao desenvolvimento de osteoblastos. Porém, estudos já demonstraram que o aumento no teor de MnO em vidros bioativos reduz a bioatividade e a taxa de dissolução desses materiais [139, 140]. O MnO também pode interferir na cristalização dos vidros bioativos, e assim reduzir seu potencial bioativo, uma vez que domínios cristalinos tendem a reduzir a possibilidade de reações de troca iônica [140, 141]. Isso demonstra que os sistemas de vidro bioativo devem ser cuidadosamente avaliados, principalmente aqueles com composições complexas, onde a adição de óxidos metálicos como ZnO, MgO e MnO produzem diferentes efeitos tanto na estrutura como no comportamento celular.

4.4 ENSAIO DE BIOATIVIDADE PROPOSTO POR KOKUBO E SUAS LIMITAÇÕES

O grupo de pesquisa liderado pelo professor Larry Hench [142] foi o primeiro a observar que vidros bioativos do tipo Bioglass® 45S5, após serem implantados no corpo, formavam em sua superfície um filme de fosfato de cálcio sobre uma camada de SiO₂. Essa camada de fosfato de cálcio precipitada na superfície do material implantado foi considerada fundamental para a ligação do material com o tecido ósseo. Esse mesmo estudo demonstrou que a formação *in vivo* da camada de fosfato de cálcio podia ser reproduzida *in vitro* expondo o material a uma solução tampão de Tris hidroximetilaminometano e ácido clorídrico (solução tampão Tris) em pH 7,4.

Semelhante ao observado pelo grupo de pesquisa de Larry Hench, Kitsugi *et al.* [143] mostraram que a vitrocerâmica A–W formava uma camada de fosfato de cálcio em sua superfície quando implantada no corpo, e tal característica permitia a ligação do material com o osso. Kokubo *et al.* [144] identificaram por microdifração de raios-X que a camada de fosfato de cálcio formada na superfície da vitrocerâmica A–W era hidroxiapatita cristalina. Também foi demonstrado que a camada de hidroxiapatita formada na superfície da vitrocerâmica A–W podia ser reproduzida *in vitro* quando em contato com SBF, mas não em solução tampão Tris [145]. Kokubo *et al.* [12] e Filgueiras *et al.* [146] confirmaram de forma independente que uma camada de hidroxiapatita se formava na superfície de vidros bioativos do tipo Bioglass® 45S5 quando em contato com SBF.

Com base nesses e outros estudos [147, 148] foi proposto que a bioatividade óssea *in vivo* de um material pode ser prevista examinando a formação da camada de hidroxiapatita em sua superfície quando em contato com SBF, e que essa camada é essencial para o material se ligar ao tecido ósseo [31]. Conforme já descrito no item 3.4, a camada de hidroxiapatita se forma através de reações de troca catiônica do material com prótons do fluido corporal *in vivo* ou fluido corporal simulado (SBF) *in vitro*.

A solução SBF originalmente usada por Kokubo *et al.* [12] e Filgueiras *et al.* [146] não continha íons SO₄²⁻, presentes naturalmente no plasma sanguíneo humano, e precisou posteriormente ser alterada [31]. A solução SBF é um modelo artificial da parte inorgânica do plasma humano, formado por uma solução supersaturada em relação a fosfatos de cálcio. A Tabela 2 apresenta um comparativo entre as concentrações iônicas

do plasma sanguíneo humano e do SBF convencional estabelecido pela norma ISO 23317¹.

Tabela 2. Concentrações iônicas do plasma sanguíneo humano e do SBF.

	Concentração dos íons (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma Sanguíneo	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5

O SBF convencional apresenta um menor conteúdo de íons carbonato (HCO₃⁻) que o plasma humano, visto que o HCO₃⁻ tende a precipitar na solução. Soluções com maior teor de HCO₃⁻ já foram testadas, porém isso influenciou negativamente a estabilidade do SBF em termos de pH, concentração de íons e formação de *clusters*. Também foi demonstrado que a maior quantidade de íons cloreto não influencia os resultados do SBF [149].

Em uma revisão sistemática realizada em 2006, Kokubo e Takadama [13] propuseram um método para avaliar a capacidade de um material se ligar de forma direta, aderente e forte ao tecido ósseo, por meio do exame da capacidade de uma camada de hidroxiapatita se formar na superfície de um material quando em contato com SBF. Nesse estudo eles concluíram que a velocidade em que a apatita se forma na superfície de um material em contato com SBF pode prever o grau de bioatividade óssea *in vivo* do material. Ou seja, quanto maior a velocidade em que a apatita se formar na superfície de um material quando em contato com SBF maior será a velocidade que esse material irá se ligar ao osso, tendo em vista que a formação de hidroxiapatita em sua superfície também será rápida dentro do organismo. Os pesquisadores afirmaram ainda que essa capacidade é mantida se não houver nenhum outro componente (íons ou substância) em sua composição que induz toxicidade ou reações imunológicas. Outra questão levantada nesse estudo foi que além de prever a bioatividade óssea *in vivo* esse método poderia ajudar na redução do número de animais utilizados e acelerar a duração de experimentos com animais. Esse método tornou-se posteriormente um dos mais utilizados para avaliar indiretamente a biocompatibilidade dos vidros bioativos [6, 11]. No entanto, o surgimento

¹ NBRISO23317 de 08/2017 - Implantes para cirurgia - Avaliação *in vitro* da capacidade de formação de apatita de materiais de implante.

de uma nova leva de biomateriais com composições complexas colocou em dúvida a real eficácia do ensaio de bioatividade proposto por Kokubo para avaliação da biocompatibilidade.

Recentemente, Bellucci *et al.* [18] demonstram em seus estudos que nem sempre uma alta bioatividade *in vitro* corresponde a uma resposta biológica melhorada de células ósseas. Tal resultado abriu novamente o questionamento sobre a confiabilidade dos ensaios propostos por Kokubo para se prever a biocompatibilidade de um biomaterial. No trabalho do Bellucci *et al.* [18] foram utilizados compósitos de vidro bioativo com diferentes proporções de hidroxiapatita e os resultados obtidos nos ensaios de bioatividade em SBF foram confrontados com a biocompatibilidade desses materiais em contato com fibroblastos murinos. Por meio do ensaio de bioatividade ficou demonstrado que os materiais com maior teor de vidro bioativo tiveram uma maior bioatividade, com pronunciada formação de hidroxiapatita na superfície. No entanto, esses mesmos materiais, com maior teor de vidro, apresentaram piores resultados nos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular. O curto período experimental e a baixa complexidade dos materiais estudados configuram-se como fatores limitantes para um maior aprofundamento nessa questão. Os autores também destacam que outros fatores físico-químicos dos materiais estão envolvidos nesse processo. Portanto, várias evidências se acumulam atualmente sugerindo que a capacidade de um material em formar uma camada de hidroxiapatita em superfície após exposição à SBF não é suficiente para comprovar sua real biocompatibilidade.

CAPÍTULO 5
METODOLOGIA

5.1 SÍNTESE DOS VIDROS

5.1.1 Vidro padrão

Uma formulação baseada no vidro bioativo 77S [150, 151] equivalente a 77% SiO₂, 14% CaO e 9% P₂O₅ (% em peso) ou 80% SiO₂, 16% CaO e 5% P₂O₅ (% em mol) foi preparada pelo método sol-gel e usada como controle (Tabela 3). A síntese do vidro com tal formulação teve início com a adição de 85,5 mL de etanol absoluto (C₂H₆O) em 81,96 mL de tetraetilortosilicato (Si(OC₂H₅)₄, TEOS), e essa mistura ficou por 30 min em agitação à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 26,46 mL de água deionizada e 1,2 mL de ácido acético glacial (CH₃COOH). A solução permaneceu sob agitação durante 60 min para completar a hidrólise e policondensação do TEOS. Posteriormente, 6,09 mL de trietilfosfato (OP(OC₂H₅)₃, TEP) e 17,1 g de nitrato de cálcio tetrahidratado (Ca(NO₃)₂·4H₂O) foram adicionados à solução, mantendo um intervalo de 60 min entre cada adição. Após o último reagente ter sido adicionado, a mistura ficou em agitação por mais 60 min para completar a reação. A solução obtida foi mantida em recipientes fechados à temperatura ambiente por 5 dias para permitir a formação do gel. O gel resultante foi seco a 60°C e 120°C por 72 e 48 h, respectivamente. Após a secagem, o material poroso (xerogel) foi triturado, peneirado e armazenado em ambiente seco. A síntese foi realizada em triplicata e todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (grau analítico > 98%). Todas as sínteses foram realizadas no *Laboratório de Biomateriais* do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS.

Tabela 3. Composição nominal dos vidros baseados no sistema 80%SiO₂ · (16% - x)CaO · x%MO · 4%P₂O₅ (% em mol), com diferentes concentrações de MO (MO = ZnO, MgO e MnO).

Amostras	Composição (% em mol)					
	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	ZnO	MgO	MnO
BV	80	4	16	–	–	–
BV+Zn	80	4	10	6	–	–
BV+Mg	80	4	10	–	6	–
BV+Mn	80	4	10	–	–	6
BV+Zn/Mg/Mn	80	4	10	2	2	2

5.1.2 Vidros contendo ZnO, MgO e MnO

Os vidros contendo MO (MO = ZnO, MgO e MnO) foram sintetizados nas mesmas condições descritas no item 5.1.2. Entretanto, a quantidade de nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) foi reduzida, enquanto o nitrato de magnésio hexa hidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), nitrato de zinco hexa hidratado ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e nitrato de manganês (II) hexa hidratado ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram incluídos na mesma proporção (Tabela 3).

5.1.3 Tratamento térmico do xerogel

Parte do pó peneirado obtido do xerogel triturado foi aquecido a 500, 600, 700 e 800°C por 2 h sob uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Após tratamento térmico, as amostras foram resfriadas ao ar e armazenadas em ambiente seco. As amostras foram analisadas por difração de raios X (DRX) em um difratômetro SHIMADZU (modelo XRD 6000) ($\text{CuK}\alpha \lambda = 1,5405 \text{ \AA}$) de $2\theta = 10^\circ$ a 60° (intervalo de medida de $0,02^\circ$ e velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$).

5.1.4 Preparação das pastilhas de vidro

Uma vez que os vidros bioativos não são aplicados na forma de pó, mas de grânulos ou peças 3D (densas ou porosas), os ensaios de bioatividade e biológicos foram realizados a partir de pastilhas compactadas do pó dos vidros sintetizados. Para isso, pastilhas com 9,0 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura foram preparadas por prensagem uniaxial a 462,14 MPa, utilizando o xerogel tratado termicamente à 120°C, triturado e peneirado (325 *mesh*). Após prensagem, as pastilhas foram calcinadas a 700°C por 2 h em uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Um resumo das etapas de preparação dos materiais pode ser visualizado na Figura 8.

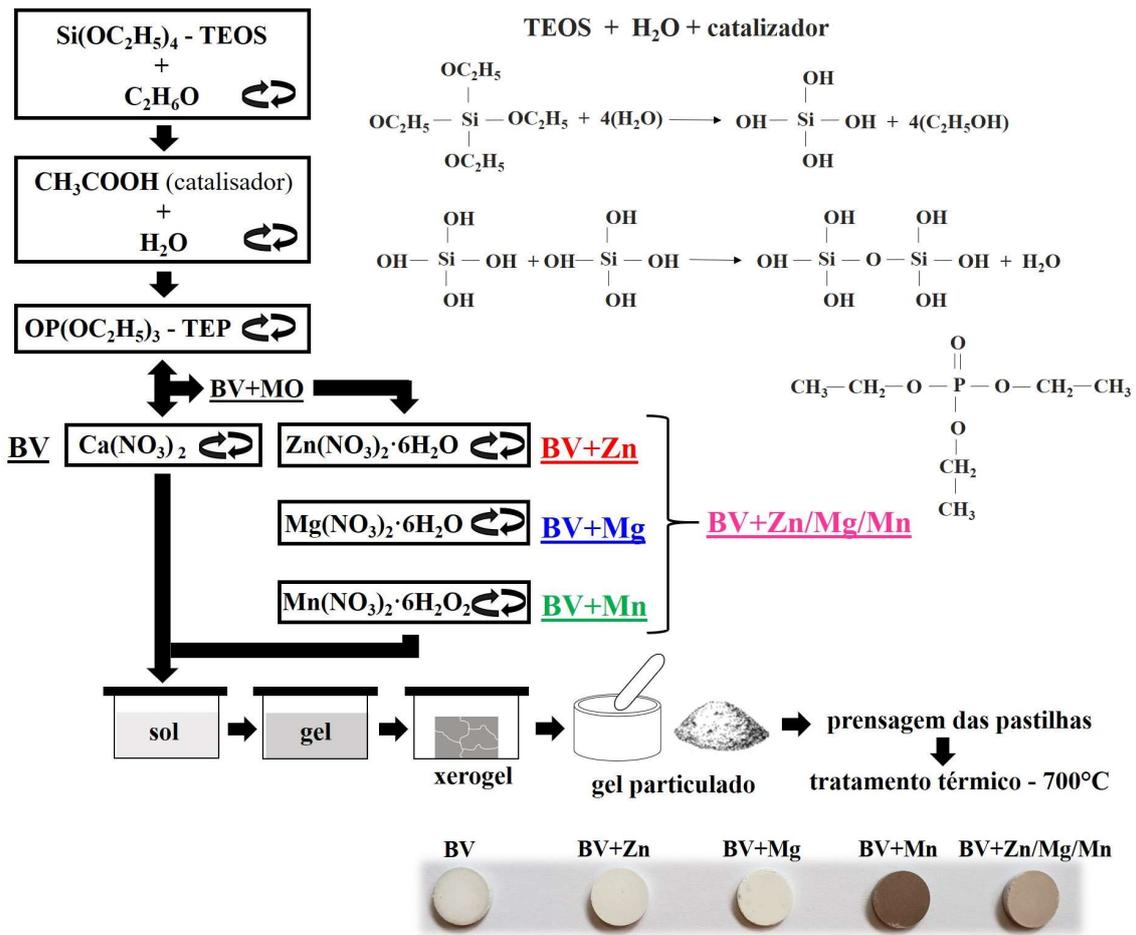


Figura 8. Esquema representativo das etapas de síntese dos vidros, evidenciando algumas reações envolvidas e etapas de pós-processamento das amostras.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS VIDROS

5.2.1 Composição

A composição elementar dos vidros foi determinada utilizando-se fluorescência de raios X por dispersão em comprimento de onda (*wavelength-dispersive X-ray fluorescence*, WDXRF) em um espectrômetro Bruker S8-Tiger 4 kW equipado com cristais LiF 200, PET, XS-5 e XS-C e calibrado a partir do *kit* S8 Bruker contendo todos elementos de interesse e nas mesmas condições de análise das amostras. Os pós tratados termicamente a 700°C foram analisados sem necessidade de compactação em atmosfera de He. Essa análise foi realizada no *Laboratório de Técnicas de Raios X* do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS.

5.2.2 Comportamento térmico

As propriedades térmicas dos sistemas vítreos foram estudadas por análise termogravimétrica (*thermogravimetric analysis*, TGA) e análise térmica diferencial (*differential thermal analysis*, DTA) usando um equipamento STA 449 F3 Jupiter (Netsch) do *Laboratório de Análises Térmicas* do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS. Para a realização das análises foi utilizado aproximadamente 60 mg dos pós de vidro sintetizados, em uma atmosfera de N₂ com uma taxa de fluxo de 50 mL min⁻¹. As amostras foram aquecidas em um cadinho de Pt a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, da temperatura ambiente a 1100°C.

5.2.3 Evolução dos grupos de silicato

Espectroscopia Raman foi usada para acompanhar as alterações nos grupos silicato dos vidros em função dos óxidos incluídos. Os espectros foram registrados usando um espectrômetro Raman HORIBA Jobin-Yvon um laser de 785 nm (40/50 mW) do *L'institut de recherche sur les céramiques* da Universidade de Limoges na França. Os espectros foram coletados por 30 s em uma faixa espectral entre 300 e 1300 cm⁻¹. Para estudar o comportamento dos oxigênios ligantes e não ligantes do tetraedro de silicato (SiO₄⁴⁻), a quantidade relativa de estruturas Qⁿ foi obtida pela deconvolução dos espectros usando o software OriginPro (2016). As curvas foram ajustadas pela função Gaussiana considerando-se a existência de múltiplos picos. As posições de picos assumidas para as estruturas Qⁿ foram baseadas no trabalho de Sharma *et al.* [152].

5.2.4 Rugosidade da superfície

Foi feita medição da rugosidade de superfície das pastilhas de vidro bioativo produzidas. Um total de 3 amostras de cada composição foram analisadas, com 4 medidas diferentes (l_1 , l_2 , l_3 e l_4) em áreas distintas de uma mesma amostra (Figura 9). As medições foram feitas seguindo as recomendações e parâmetros estabelecidos pela ASTM D7127-13 [153], utilizando um rugosímetro MITUTOYO SJ-410 do *Laboratório de Microestruturas e Propriedades Mecânicas* do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS. O raio da ponta do apalpador foi de 2,5 µm, e o parâmetro de medição escolhido foi o Ra.

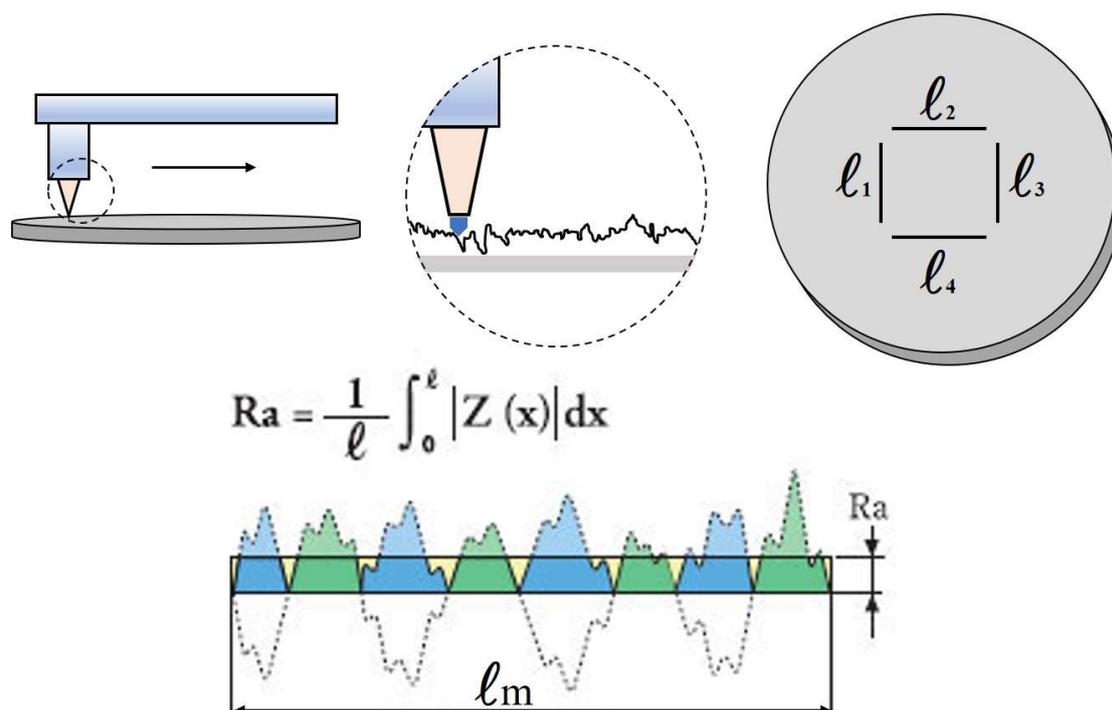


Figura 9. Representação da metodologia adotada para realização do ensaio de rugosidade, onde l_1 , l_2 , l_3 e l_4 correspondem as áreas selecionadas para medição da rugosidade de superfície das pastilhas.

5.3 AVALIAÇÃO DA DISSOLUÇÃO E BIOATIVIDADE *IN VITRO*

A bioatividade dos vidros foi estudada imergindo-os em uma solução de fluido corporal simulado (SBF) a 37°C por 1 e 7 dias, de acordo com Kokubo *et al.* [2]. As alterações topográficas e químicas na superfície das amostras ao longo do ensaio foram determinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por dispersão em energia (*energy-dispersive X-ray spectroscopy*, EDS) em um microscópio JEOL JSM-5700 do *Laboratório de Microscopia Eletrônica* do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS. A topografia foi observada usando-se um detector de elétrons secundário sob uma tensão de aceleração de feixe de 5 kV para evidenciar superfície. As amostras foram previamente revestidas com Au (aproximadamente 30 nm de espessura) usando-se um sistema de pulverização (*sputtering*) Denton Vacuum (Desk V). O EDS foi realizado em alta tensão (15 kV) para garantir a excitação de todas as linhas de raios X dos elementos de interesse. Para o EDS, as amostras foram revestidas com Ag para evitar a sobreposição típica entre as linhas de

emissão de raios X de Au e P, uma vez que o P seria quantificado nas amostras. Modificações estruturais na superfície das pastilhas também foram acompanhadas por difração de raios X com incidência rasante (*grazing incidence X-ray diffraction*, GIXRD), com ângulo fixo de incidência de 1°, em um difratômetro SHIMADZU XRD 6000 do *Laboratório de Técnicas de Raios X* do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS.

As concentrações de SiO_4^{4-} , PO_4^{3-} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} foram monitoradas no meio SBF ao longo do ensaio de bioatividade por espectroscopia de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP-OES) em um espectrômetro de emissão óptica Varian 720-ES do *Laboratório de Química de Água* do Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe. Alíquotas da solução de SBF extraídas em cada ponto do tempo foram diluídas em água ultrapura (1:10) antes da inserção no plasma de Ar. A intensidade e o comprimento de onda de emissão dos elementos Si, P, Ca, Zn e Mg foram lidos simultaneamente e sua concentração foi calculada a partir de uma curva de calibração ($R^2 > 0,91$) construída com as seguintes concentrações padrão: 0,0; 0,1; 0,3; 0,8; 1,0; 2,0; 5,0; 8,0; 10,0; 30,0; 50,0; 80,0 e 100,0 mg L⁻¹. As medições foram realizadas em triplicata.

5.4 COMPORTAMENTO CELULAR

5.4.1 Cultura de células

Os ensaios de adesão, proliferação e diferenciação foram realizados utilizando células de osteossarcoma humano da linhagem MG-63, semelhantes a osteoblastos, fornecidas pela Universidade Federal Fluminense do Rio de Janeiro (UFF) na Sala de Cultura de Células do *Laboratório de Biomateriais* do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS. As células MG-63 foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle medium*, DMEM) (Sigma-Aldrich), suplementado com soro bovino fetal a 10% (SBF) (Cultilab), L-glutamina a 1% e penicilina/estreptomicina a 1%. Antes dos ensaios, as pastilhas de vidro bioativo foram esterilizadas a seco a 180°C por 3 h.

5.4.2 Adesão e proliferação celular

A adesão e proliferação celular foram avaliadas usando-se o método do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]}. Este método baseia-se na redução do MTT por células viáveis que formam cristais de formazan coloridos, refletindo o nível do metabolismo celular. Inicialmente, as pastilhas de vidro esterilizadas foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços e pré-condicionadas por 2 h em DMEM suplementado com 10% de SBF e antibióticos em uma incubadora (LS Logen) a 37°C sob uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% CO₂.

O meio foi removido e 10⁵ células suspensas em 20 µL de DMEM suplementado foram inoculadas no centro de cada pastilha de vidro. Após 1 h, 1000 µL de DMEM suplementado foi adicionado a cada poço, e as placas de cultura foram incubadas novamente sob condições de cultura de células por 1, 7, 14 e 21 dias. Como controle para o ensaio de adesão (1 dia), as células foram inoculadas diretamente na placa e cultivadas em meio DMEM [36, 37]. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h. Após cada período experimental, o meio de cultura foi removido da placa e 500 µL de reagente MTT (Sigma-Aldrich) foi adicionado em cada um dos poços da placa. As células foram incubadas novamente protegidas da luz na mesma condição por 3 h. Posteriormente, o reagente MTT foi removido e 500 µL de isopropanol acidificado (HCl a 0,3% de isopropanol) foi adicionado em cada poço, por um período de 10 min em condições de cultura de células para dissolver os cristais de formazan. A densidade óptica (absorbância) foi medida em um leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Reade) do *Laboratório de Enzimologia* do Departamento de Fisiologia da UFS, com um filtro de 570 nm. Foram utilizadas cinco amostras para cada condição ($n = 5$) no ensaio de adesão e três ($n = 3$) no ensaio de proliferação.

O número de células nas amostras foi calculado a partir de uma curva de calibração construída pela correlação linear entre absorbância e o número de células MG-63 crescidas nas placas de cultura. Uma linha de base foi criada considerando a absorbância medida nos reagentes puros na ausência de cristais de formazan. Os resultados da adesão e proliferação foram expressos em % de células semeadas.

Para análises de MEV, após o tempo de incubação, as amostras foram lavadas três vezes em PBS e fixadas em uma solução de glutaraldeído a 4% e *p*-formaldeído a 2% em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) por 2 h. As amostras foram então desidratadas em concentrações crescentes de etanol (15%, 35%, 50%, 70%, 90% e 100%), secas por

adição de HMDS, seguida de evaporação durante a noite e revestidas com Au (aproximadamente 30 nm de espessura) usando-se um sistema de pulverização (*sputtering*) Denton Vacuum (Desk V). As células foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL 5700 sob 5 kV.

5.4.3 Diferenciação celular

A diferenciação celular foi avaliada medindo-se a atividade da fosfatase alcalina (*alkaline phosphatase*, ALP) produzida pelas células osteoblásticas ao longo do tempo. Utilizou-se o procedimento descrito no item 5.4.2. Inicialmente 10^4 células foram semeadas no centro de cada pastilha de vidro e cultivadas por 7, 14 ou 21 dias a 37°C sob uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO_2 . O meio de cultura foi trocado a cada 48 h. Em cada tempo experimental, o meio de cultura foi removido e 500 μL de Triton X-100 (0,5%) e 500 μL de solução tampão alcalina de *p*-nitrofenilfosfato foram adicionados como substrato (20 mmol L^{-1} de *p*-nitrofenilfosfato + 100 mmol L^{-1} dietanolamina 98% + 10 mmol L^{-1} MgCl_2 , pH 9,5) por 30 min a 37°C . A reação enzimática foi encerrada pela adição de 0,1 mol L^{-1} de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 1 mol L^{-1} de hidróxido de sódio (solução *stop*). A atividade enzimática foi determinada por análise colorimétrica de *p*-nitrofenol, um produto da hidrólise de *p*-nitrofenilfosfato, conhecido marcador de diferenciação de células osteoblásticas. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Reade) com um filtro de 405 nm e os resultados foram expressos em valores absolutos de densidade óptica. Três amostras para cada condição ($n = 3$) foram utilizadas para o ensaio de diferenciação.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises quantitativas foram realizadas em triplicata, utilizando amostras obtidas de três sínteses independentes ($n = 3$). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. A significância estatística dos dados obtidos foi avaliada através da análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Diferenças de $p \geq 0,05$ foram consideradas estatisticamente insignificantes.

CAPÍTULO 6
RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 INFLUÊNCIA DOS ÓXIDOS NA ESTRUTURA DO VIDRO

A composição elementar dos vidros foi analisada por WDXRF, utilizando-se as amostras sintetizadas. Os resultados confirmaram a presença de SiO₂, P₂O₅, CaO, além de ZnO, MgO e MnO nas amostras em que o CaO foi substituído parcialmente por tais óxidos (Tabela 4). Os valores medidos foram muito próximos dos valores nominais (calculados) para três sínteses independentes, indicando que a síntese é reprodutível. As pequenas variações podem estar associadas aos diferentes níveis de hidratação dos produtos químicos e ao já conhecido comportamento de evaporação de TEP durante o tratamento térmico [154].

Tabela 4. Composições dos vidros sintetizados medidas por WDXRF. Os valores nominais (calculados) estão expressos em negrito. Os valores obtidos experimentalmente estão representados com seus respectivos desvios padrão referentes a três sínteses independentes ($n = 3$).

Amostras	Composição (% em mol)					
	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	ZnO	MgO	MnO
BV	80 80,52 ± 1,26	4 3,39 ± 0,16	16 16,09 ± 1,10	–	–	–
BV+Zn	80 79,74 ± 0,09	4 3,41 ± 0,05	10 10,31 ± 0,04	6 6,61 ± 0,16	–	–
BV+Mg	80 80,11 ± 0,24	4 3,30 ± 0,07	10 10,03 ± 0,14	–	6 6,57 ± 0,04	–
BV+Mn	80 80,74 ± 0,64	4 3,31 ± 0,16	10 10,19 ± 0,31	–	–	6 5,77 ± 0,17
BV+Zn/Mg/Mn	80 79,61 ± 0,05	4 3,48 ± 0,03	10 10,42 ± 0,06	2 2,29 ± 0,03	2 2,20 ± 0,01	2 2,01 ± 0,06

A substituição de 6% do CaO pelos óxidos de ZnO, MgO e MnO, tanto individualmente como em associação simultânea, teve como propósito evidenciar o efeito dos óxidos sobre as características físico-químicas dos vidros, bioatividade em SBF e o comportamento de células osteoblásticas (MG-63) cultivadas sobre sua superfície, na tentativa de evitar que surgissem dúvidas com relação a interferência de outros estímulos. Entretanto, tendo em vista que os efeitos podem variar com relação a concentração [45], não se pode descartar o fato de que essa concentração pode até mesmo produzir um efeito tóxico sobre as células.

O comportamento térmico das amostras na forma de xerogel (antes do tratamento térmico a 700°C) foi avaliado por TGA (Figura 10) e DTA (Figura 11). As curvas de TGA obtidas podem ser divididas em duas zonas distintas de perda de massa (I e II) para todas as amostras. A primeira perda de massa ocorreu em torno de 150°C e foi atribuída à remoção de água/umidade e etanol fisicamente adsorvidos [34]. Este é um processo endotérmico típico e pode ser confirmado pelas curvas de DTA nessa mesma região de temperatura.

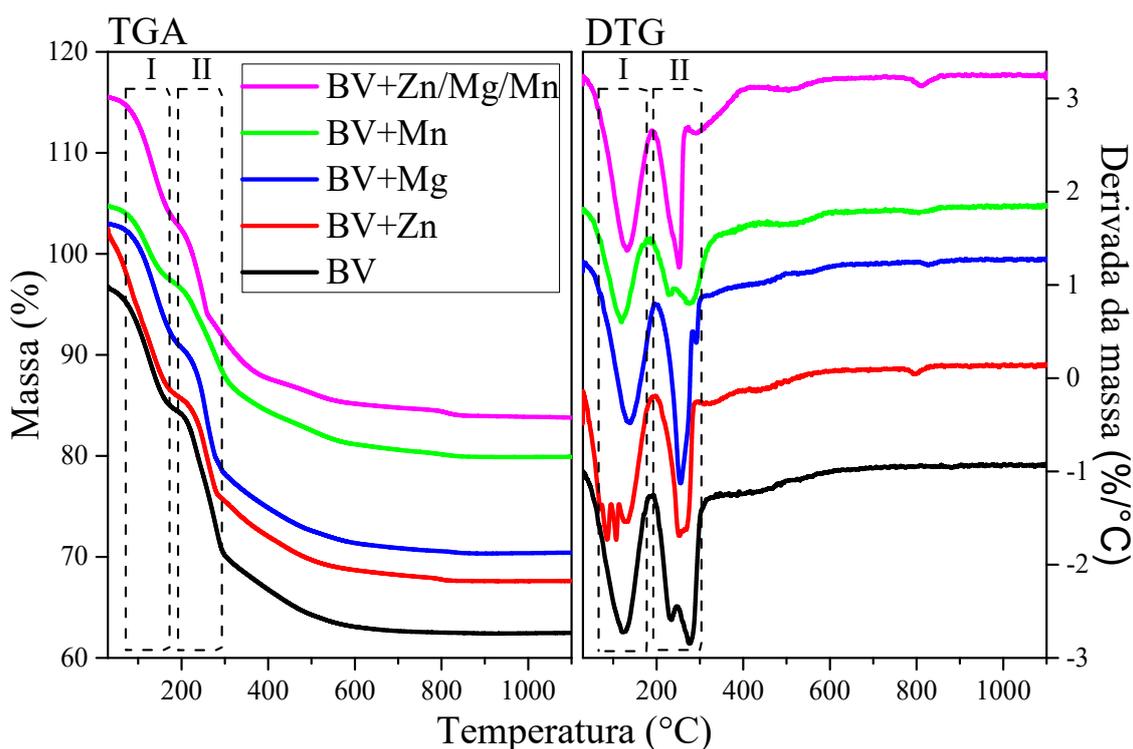


Figura 10. Análise termogravimétrica (TGA/DTG) dos xerogéis sintetizados². Os principais eventos de perda de massa estão representados nas curvas como regiões designadas I e II.

O segundo evento de perda de massa ocorreu entre 200 e 300°C e foi associado à remoção de água quimicamente adsorvida e a degradação térmica de resíduos orgânicos e grupos nitrato [154]. Um pico exotérmico foi observado nas curvas de DTA na mesma região de temperatura. A partir de 650°C, a perda de massa pode ser considerada insignificante, uma vez que a variação de massa a partir dessa temperatura é menor que

² OBS: os pontos iniciais das curvas foram alterados nos gráficos para uma melhor visualização, evitando superposições; considere todas as curvas de TGA e DTG iniciando nos valores 100% e zero, respectivamente.

5% para todas as amostras, indicando uma completa remoção dos resíduos (água, etanol e nitratos).

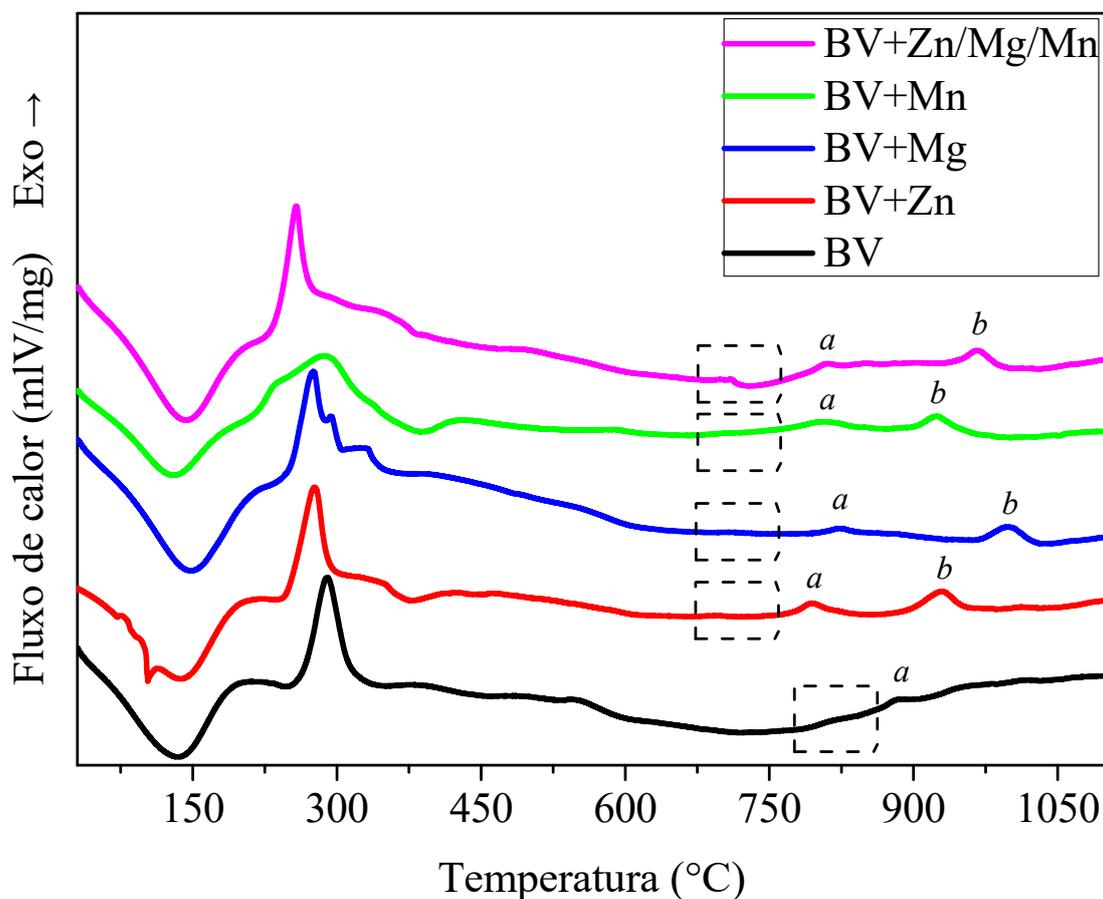


Figura 11. Análise térmica diferencial (DTA) do pó das amostras (xerogel) após secagem a 120°C. *a* e *b* representam eventos exotérmicos relacionados a cristalização e as áreas demarcadas por linhas tracejadas representam as regiões em que ocorre a T_g para cada amostra.

Com base na análise dos eventos exotérmicos ou endotérmicos evidenciados pela análise de DTA foi possível determinar a temperatura de transição vítrea (T_g) e as temperaturas de cristalização (T_c) dos vidros produzidos (Figura 12). Esses eventos térmicos são caracterizados pelo início da mudança do fluxo de calor (*onset*), ponto médio (*midpoint*), término da mudança do fluxo de calor (*endset*) e por mudança de fluxo de calor de evento. Os valores de T_g extraídos da região do ponto médio (*midpoint*) e os valores de T_c extraídos da região referente a temperatura de pico (T_{peak}) de cada evento de cristalização estão apresentados na Tabela 5.

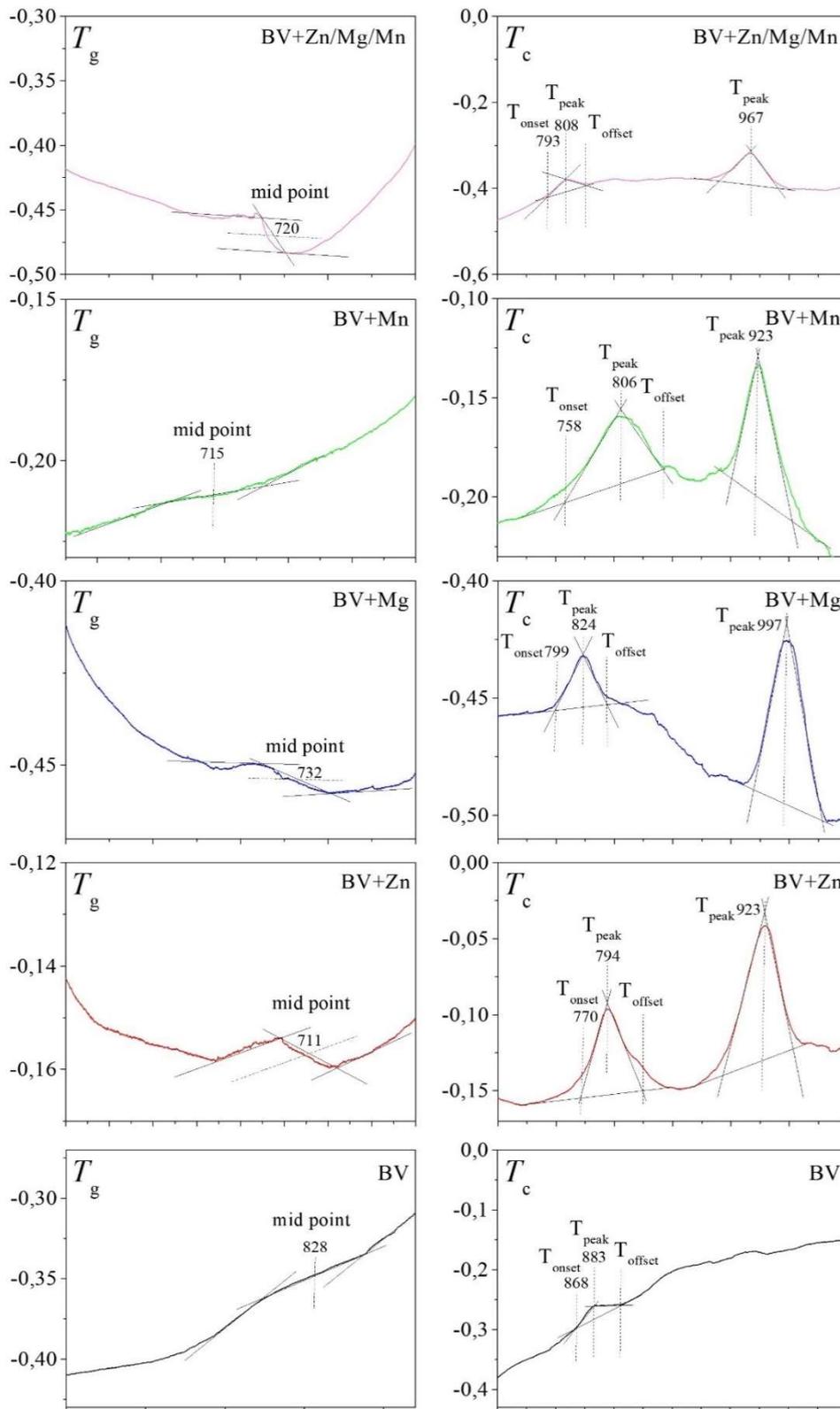


Figura 12. Determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de cristalização (T_c) com base na análise térmica diferencial (DTA). Onde: mid point indica o ponto médio da região da T_g , T_{onset} indica o início do evento térmico, T_{offset} indica o término do evento térmico e T_{peak} representa a temperatura de pico.

Os resultados demonstram que para as amostras nas quais o CaO foi substituído pelos óxidos metálicos de ZnO, MgO e MnO a T_g ocorreu em torno de 720°C. No entanto, para o material controle a T_g ultrapassou os 800°C. As temperaturas de cristalização (T_c) também diminuíram com a adição de ZnO, MgO e MnO. A adição de ZnO (BV+Zn) promoveu a maior queda na T_c , com uma diferença de 117°C em comparação com a amostra BV em que o CaO não foi substituído. A amostra BV+Mn apresentou resultados semelhantes aos observados em BV+Zn, apresentando uma redução de 113°C na T_c em comparação com BV. A amostra BV+Mg apresentou uma redução de 96°C na T_c quando comparada a BV, sendo a amostra com menor redução da T_c . A amostra BV+Zn/Mg/Mn teve a T_c reduzida em 108°C em comparação a BV, demonstrando que o ZnO e MnO exercem maior influência na redução de T_c que o MgO.

Tabela 5. Temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de início da cristalização (T_i) e temperaturas de cristalização (T_c) obtidas por análise térmica diferencial (DTA).

Amostras	T_g (°C)	Temperatura de cristalização (°C)		
		T_i	T_c	
			<i>a</i>	<i>b</i>
BV	828	868	883	
BV+Zn	711	770	794	929
BV+Mg	732	799	824	997
BV+Mn	715	758	806	923
BV+Zn/Mg/Mn	720	793	808	967

Os resultados de DTA foram comparados com os padrões de DRX obtidos das amostras tratadas termicamente a 500, 600, 700 e 800°C (Figura 13). Até 700°C todas as amostras apresentam características de difração de vidro amorfo, com halos largos típicos de vidros de silicato entre 15° e 35° [155].

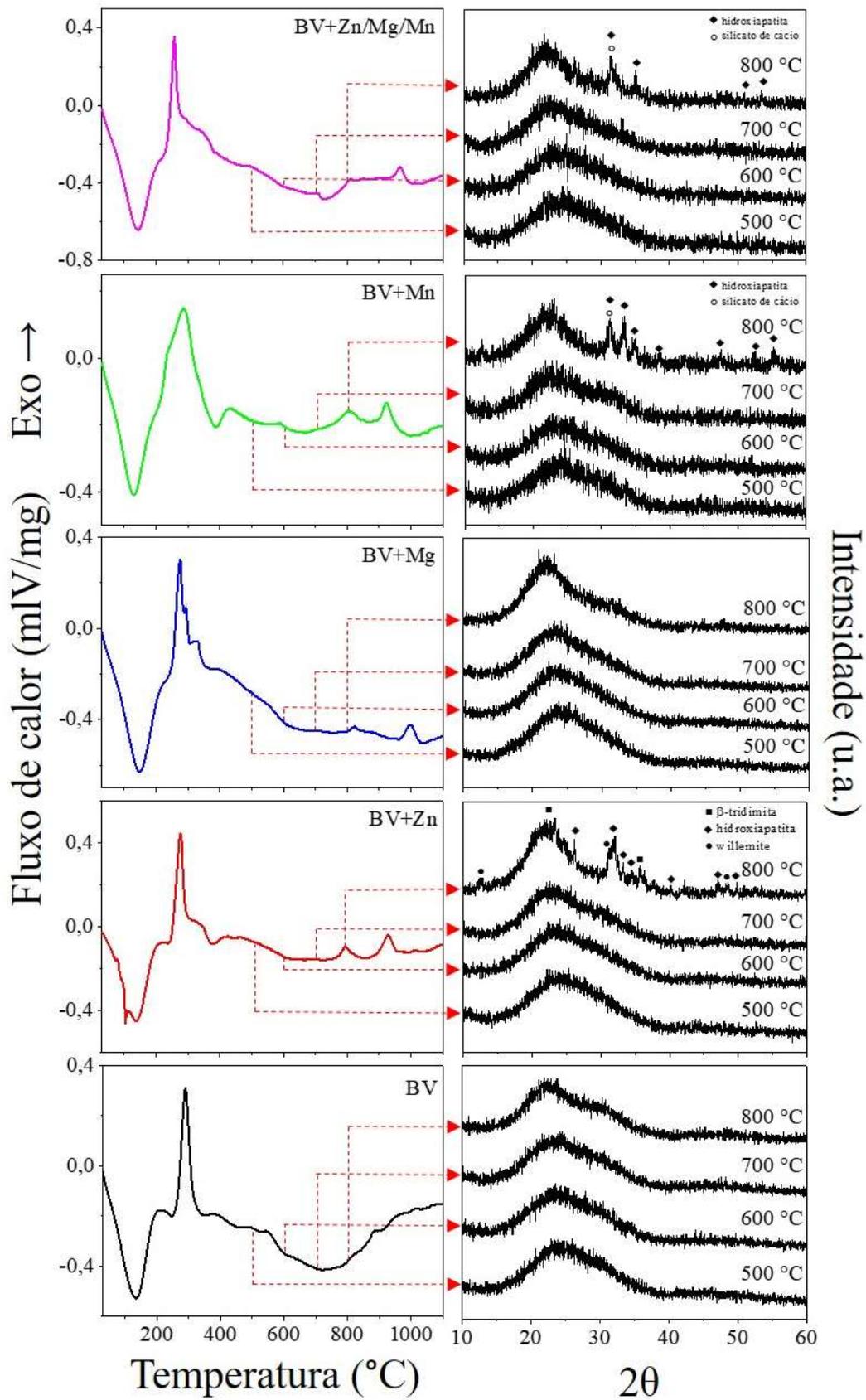


Figura 13. Análise térmica diferencial (DTA) dos xerogéis sintetizados (esquerda) em associação com DRX obtida a 500, 600, 700 e 800°C (direita). Fases identificadas: ■ β -tridimita, ♦ hidroxiapatita, ° silicato de cálcio e • willemite.

Após serem tratadas a 800°C, alguns picos referentes ao surgimento de fases ordenadas (cristalização) podem ser observados nas amostras de BV+Zn, BV+Mn e BV+Zn/Mg/Mn. As fases cristalinas β -tridimita (SiO_2 ; 38126-ICSD) [156], hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; 151414-ICSD) [156] e silicato de cálcio (CaSiO_3 = 40658-ICSD) [157] foram identificadas. Essas fases já foram descritas em sistemas vítreos após tratamento térmico [34, 158, 159]. Além disso, também foi encontrada a willemita (Zn_2SiO_4 ; 2425-ICSD) [160], o que é tipicamente observado durante a cristalização de vidros de silicato contendo ZnO acima de 720°C. Nas amostras BV e BV+Mg, não foi possível observar picos de difração em nenhuma das temperaturas testadas, indo de acordo com os resultados de DTA, onde para essas amostras a temperatura referente aos eventos de cristalização ultrapassou 800°C.

Os achados das análises de DRX são mais um indicativo de que a T_g se encontra em temperaturas entre 700°C e 800°C para as amostras em que o CaO foi substituído pelos óxidos metálicos. Portanto, a diminuição da T_g induzida pela presença de óxidos metálicos aumentou a mobilidade das cadeias de sílica, promovendo a cristalização em temperatura mais baixas. A susceptibilidade à cristalização promovida pelos óxidos pode ser classificada em: $\text{ZnO} > \text{MnO} > \text{MgO} > \text{CaO}$.

Para confirmar o estado não cristalino da superfície das pastilhas após o tratamento térmico, utilizou-se a técnica de difração de raios X com incidência rasante (GIXRD) (Figura 14). Uma vez que o comportamento de osteoblastos humanos vai ser avaliado via cultivo direto sobre a superfície de pastilhas dos vidros em questão, torna-se imprescindível confirmar se o estado não cristalino observado no *bulk* das amostras também se repete na superfície, tendo em vista que a cinética de cristalização de superfície pode ser distinta do *bulk* [116].

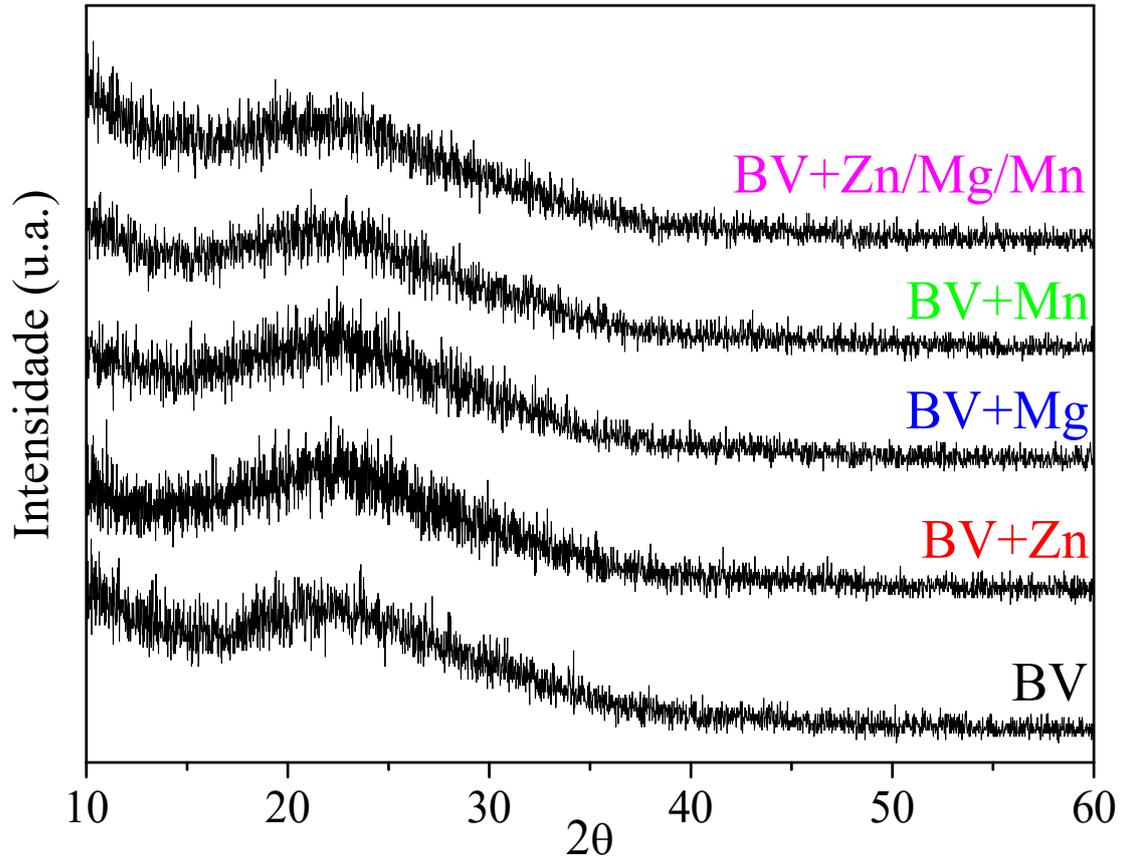


Figura 14. Difração de raios X com incidência rasante (GIXRD) da superfície dos vidros tratados termicamente a 700°C.

Com base nos padrões obtidos por GIXRD é possível afirmar que após o tratamento térmico a 700°C a superfície das pastilhas de todas as composições continuam apresentando desordem típica de uma fase não cristalina. Em geral, a cristalização de vidros bioativos após tratamento térmico pode reduzir sua bioatividade, pois a presença de fases cristalinas reduz a solubilidade e reações de troca iônica em ambientes fisiológicos [161].

Os espectros de Raman das amostras de vidro produzidas são mostrados na Figura 15. Mudanças na mobilidade das cadeias podem ser explicadas geralmente por modificações estruturais na disposição das unidades tetraédricas de silicato SiO_4^{4-} (Q^n) que formam as cadeias de silicato. Nas estruturas Q^n , n refere-se ao número de oxigênios ligantes (BO) por tetraedro de silicato. As bandas vibracionais localizadas em 430, 490 e 600 cm^{-1} foram atribuídas aos modos de estiramento das estruturas w_1 , D_1 e D_2 na rede vítrea (Figura 16) [162–165].

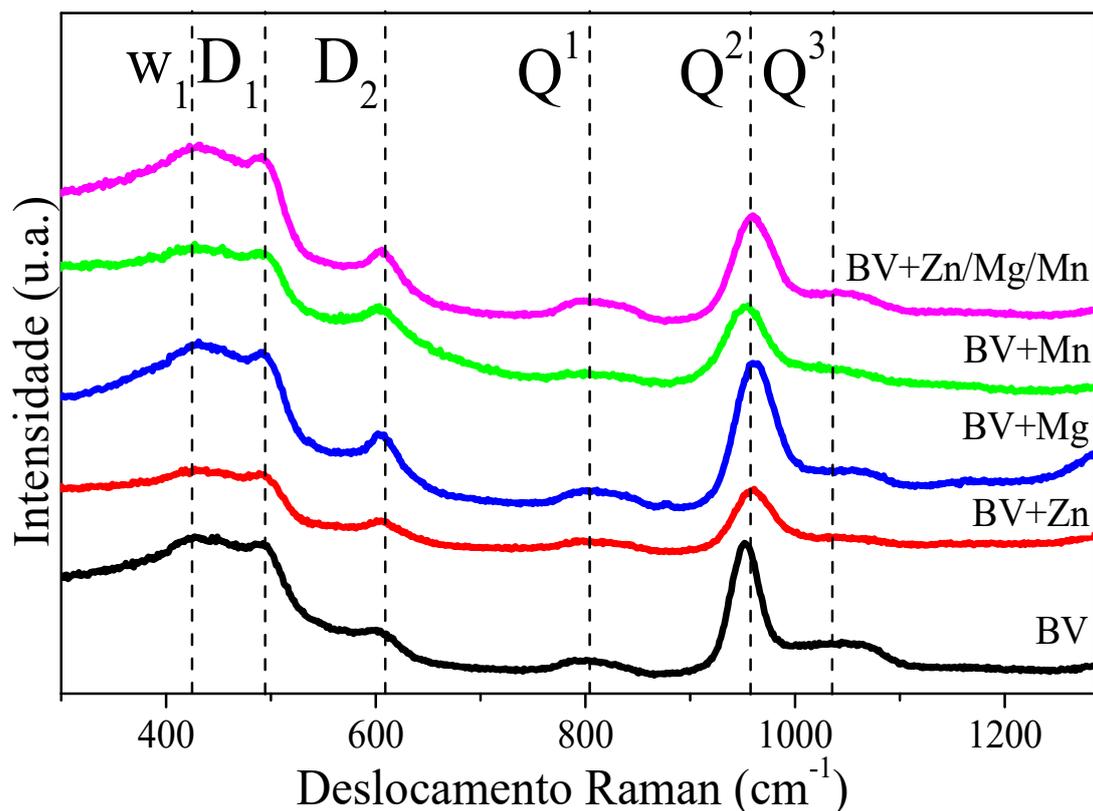


Figura 15. Espectros Raman dos vidros tratados termicamente a 700°C demonstrando as bandas vibracionais de silicato.

Bandas Raman presentes na região de 800-1100 cm^{-1} foram atribuídas à vibração assimétrica do tetraedro de SiO_4 [166]. Grupos Si-O-H também podem estar presentes nessa faixa espectral, porém sua localização é comprometida, pois eles aparecem na mesma faixa de alguns dos sinais mencionados acima [165]. Bandas centradas em 800, 950 e 1060 cm^{-1} estão associadas às unidades de silicato Q^1 , Q^2 e Q^3 , respectivamente [158]. A banda presente em 960 cm^{-1} também pode ser atribuída a vibrações do modo $\nu(\text{P-O})$ de unidades PO_4^{3-} presentes no vidro bioativo 77S [165]. Devido à grande quantidade de SiO_2 presente na composição do vidro o modo de estiramento $\nu(\text{Si-O})$ a 950 cm^{-1} foi predominante. A atribuição de grupos tetraédricos de SiO_4 e fosfato está de acordo com a literatura [16, 167].

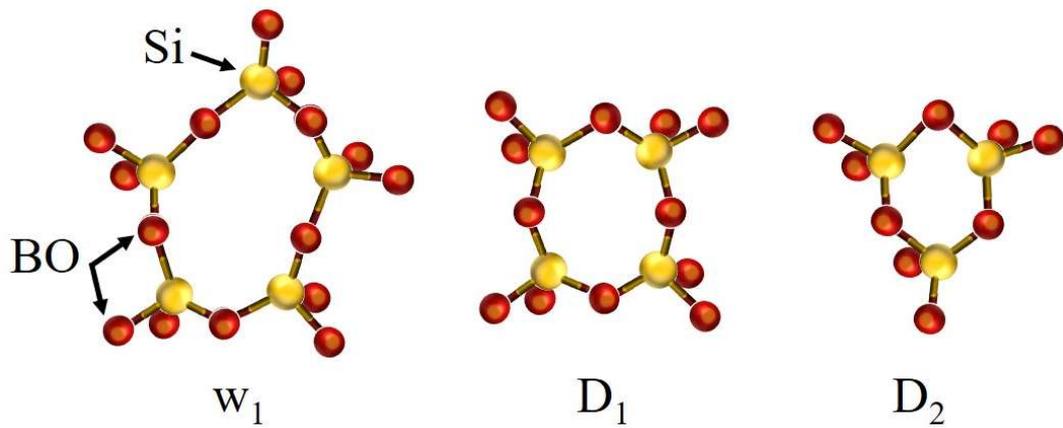


Figura 16. Representação das estruturas w_1 , D_1 e D_2 , onde w_1 refere-se às vibrações dos grupos Si–O–Si presentes em anéis com cinco ou mais unidades Q^4 , D_1 anéis com quatro unidades Q^4 e D_2 anéis com três unidades Q^4 . Esferas amarelas representam os átomos de silício (Si), esferas vermelhas significam presença de oxigênio ligante (BO).

Para estimar a quantidade relativa de unidades de silicato Q^n em cada amostra, as curvas de Raman entre 750 e 1100 cm^{-1} foram deconvoluídas e os espectros corrigidos foram então ajustados com picos gaussianos atribuídos a vibrações individuais de acordo com a literatura (Figura 17) [152]. A área sob esses picos fornece estimativas da quantidade relativa de unidades estruturais Q^1 , Q^2 e Q^3 na amostra em valores percentuais (Figura 17, canto inferior direito).

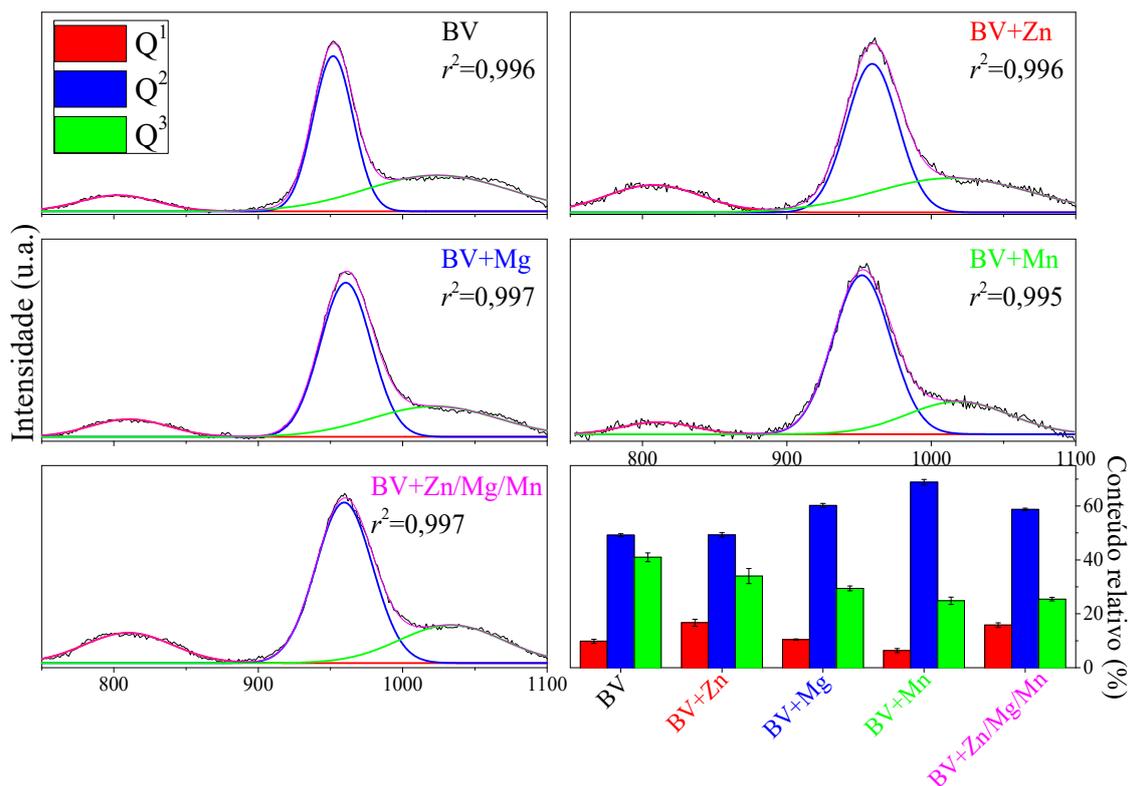


Figura 17. Deconvolução dos espectros Raman e teor relativo das unidades estruturais Q^1 , Q^2 e Q^3 .

Através da deconvolução dos espectros de Raman, é possível observar que antes da substituição do CaO por ZnO, MgO ou MnO (amostra BV), as unidades Q^2 e Q^3 eram predominantes. Após a substituição, as unidades Q^3 reduziram enquanto Q^2 e Q^1 aumentaram. Esse resultado sugere que a adição de óxidos na rede de vidro rompeu as ligações covalentes de silicato Si–O–Si, levando à formação de oxigênios não ligantes (*nonbridging oxygens*, NBO). Os valores absolutos utilizados para o cálculo percentual de Q^1 , Q^2 e Q^3 e valores de r^2 estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores absolutos da área sob os picos (A) utilizados para o cálculo percentual da quantidade relativa de unidades estruturais Q^1 , Q^2 e Q^3 e valores de r^2 , obtidos pela deconvolução gaussiana dos espectros de Raman utilizando o software OriginPro 2016®.

Equação	$Y = y_0 + A/(w*\sqrt{\pi/(4*\ln(2))}) * \exp(-4*\ln(2)*(x-x_c)^2/w^2)$			
Amostras	A			r^2
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	
BV	53944,80 ± 4017,16	269494,25 ± 2920,77	224537,18 ± 8836,81	0,996
BV+Zn	52329,55 ± 4034,93	154462,95 ± 2467,73	106620,05 ± 8768,62	0,996
BV+Mg	65093,15 ± 1549,10	376331,74 ± 4777,25	183988,63 ± 5680,25	0,997
BV+Mn	21819,51 ± 2587,86	235844,13 ± 3525,80	85097,84 ± 4729,50	0,995
BV+Zn/Mg/Mn	85097,84 ± 4729,50	316385,53 ± 2356,07	136960,92 ± 3627,14	0,997

De acordo com o modelo de Rede Aleatória Contínua (*continuous random network*, CRN) proposto por Zachariasen-Warren [56, 168] e a Teoria de Redes proposta por Dietzel [59], os elementos podem ser classificados como modificadores de rede ($F = 0,1 - 0,4$), intermediários ($F = 0,5 - 1,0$) e formadores de rede ($F = 1,3 - 2,0$) de acordo com a intensidade do campo (F). Em nossas amostras, o Ca ($F = 0,33$) foi substituído por Zn ($F = 0,43$), Mg ($F = 0,45$) ou Mn ($F=0,40$), todos ainda classificados como modificadores de rede [18, 26]. Sabe-se que os modificadores agem rompendo a rede tridimensional contínua de vidro, diminuindo a quantidade dos oxigênios ligantes (*bridging oxygens*, BO) e, conseqüentemente, formando NBO. A Figura 18 relaciona os valores ponderados da energia de dissociação de cada vidro produzido neste estudo com seus valores de Q^1 e T_c .

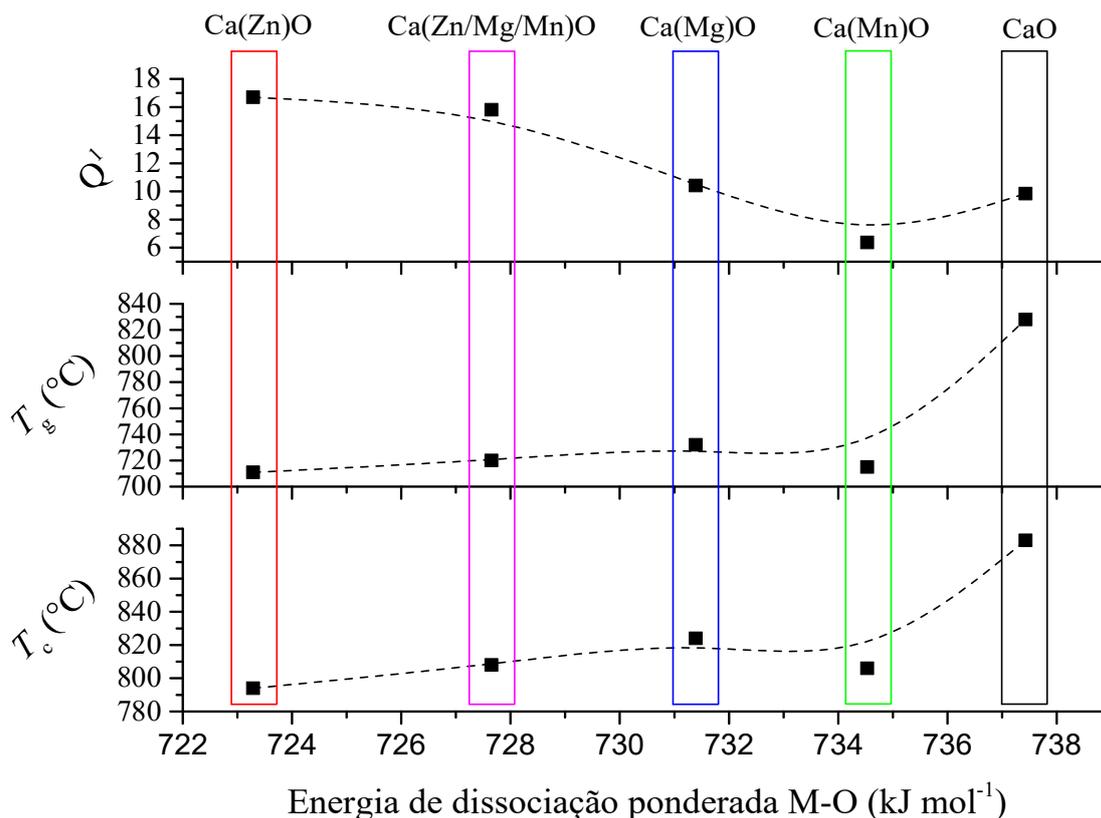


Figura 18. Relação entre a energia de dissociação de cada sistema vítreo com seus valores de Q^1 , T_g e T_c .

Pode-se observar que a entrada de elementos metálicos na rede reduz a energia de dissociação do vidro, o que acaba diminuindo a T_c e, ao mesmo tempo, ocorre um aumento das unidades Q^1 . Isso demonstra a correlação entre os resultados acima discutidos.

Nesse estudo o Ca ($F=0,33$) foi substituído por Zn ($F=0,43$), Mg ($F=0,45$) e Mn ($F=0,40$), todos considerados modificadores de rede [18, 26]. A adição de elementos modificadores na rede produz a quebra das ligações covalentes Si–O do silicato a formação dos chamados oxigênios não ligantes (NBO). Na Figura 17 fica demonstrado o efeito da adição dos óxidos modificadores na redução da T_c e das ligações do tipo Q^1 . Quanto maior a concentração desses elementos modificadores, maior a formação de NBO [169]. Com a substituição de CaO por ZnO, MgO e MnO ocorre um aumento na quantidade da fase amorfa separada, resultado da quebra de ligações do tipo Si–O–Si, aumentando o número de NBO [170], e conseqüentemente, reduzindo a T_c do material.

Além disso, outra explicação para uma diminuição da T_c dos materiais produzidos é a menor força de ligação do Zn–O [85, 171], Mg–O [85, 172] e Mn–O [26] recém formadas quando comparadas a Si–O.

6.2 INFLUÊNCIA DOS ÓXIDOS NA BIOATIVIDADE

A bioatividade das amostras foi avaliada diretamente pelas transformações morfológicas (Figuras 19–23) e composicionais (Figura 24) da superfície dos vidros produzidos após imersão em SBF por 1 e 7 dias. As imagens de MEV adquiridas demonstram que a superfície da amostra controle (BV) foi completamente modificada após 7 dias de imersão em SBF, apresentando aglomerados globulares depositados em sua superfície. Nas demais amostras, tais modificações não foram observadas. A análise elementar da superfície da amostra BV realizada por EDS mostra um aumento nas quantidades de P_2O_5 e CaO na superfície dessa amostra, indicando a deposição de uma camada formada basicamente por fosfato de cálcio. Por outro lado, a quantidade de SiO_2 presente na superfície de BV diminuiu após 7 dias de imersão, sendo mais um indicativo da precipitação da camada de fosfato de cálcio na superfície da amostra, dificultando a detecção das camadas mais inferiores do vidro. Nas amostras em que o CaO foi parcialmente substituído pelos óxidos metálicos esse comportamento não foi observado.

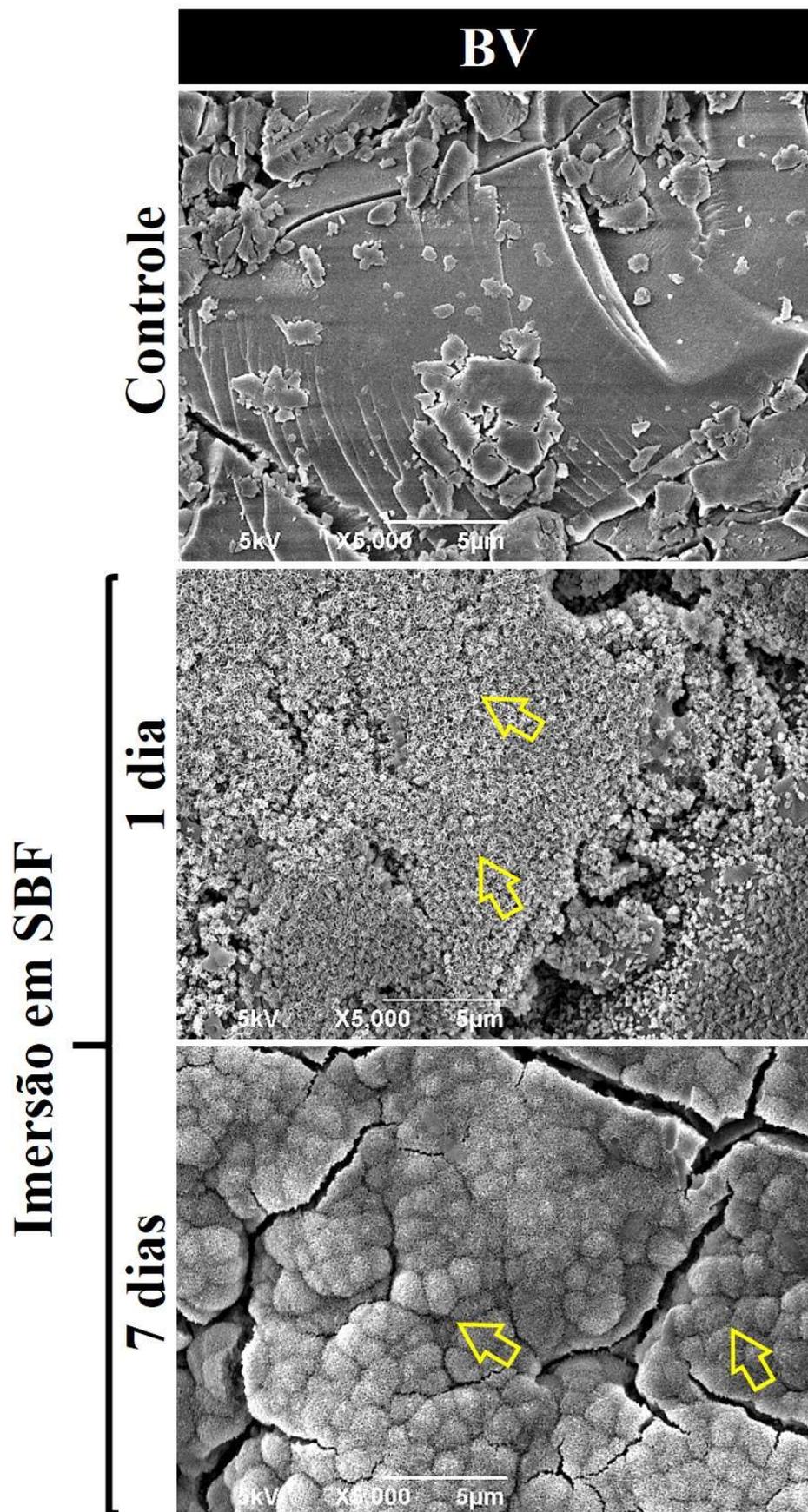


Figura 19. Imagens de MEV da superfície de BV antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF. Setas amarelas: aglomerados de fosfato de cálcio.

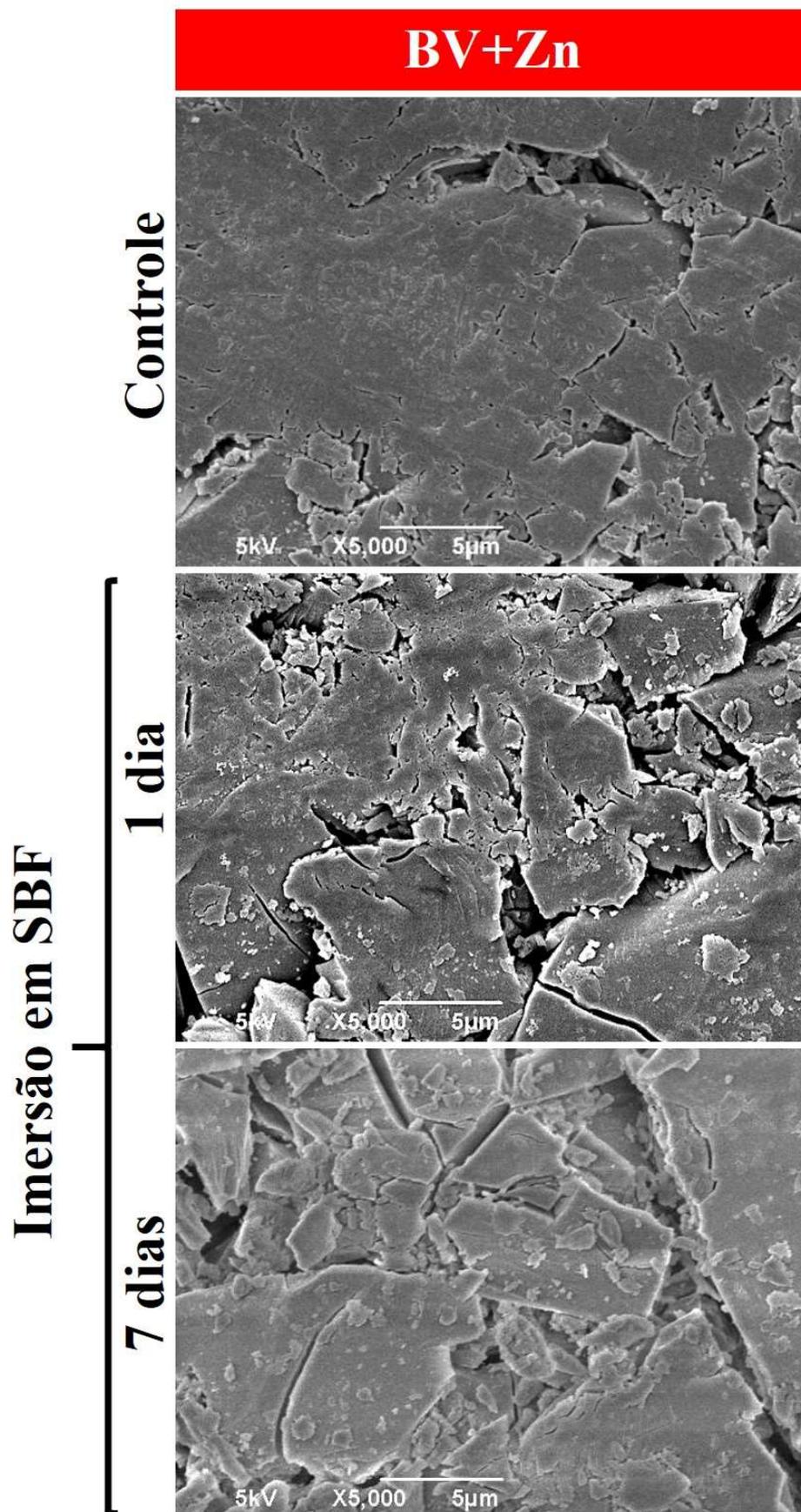


Figura 20. Imagens de MEV da superfície de BV+Zn antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF.

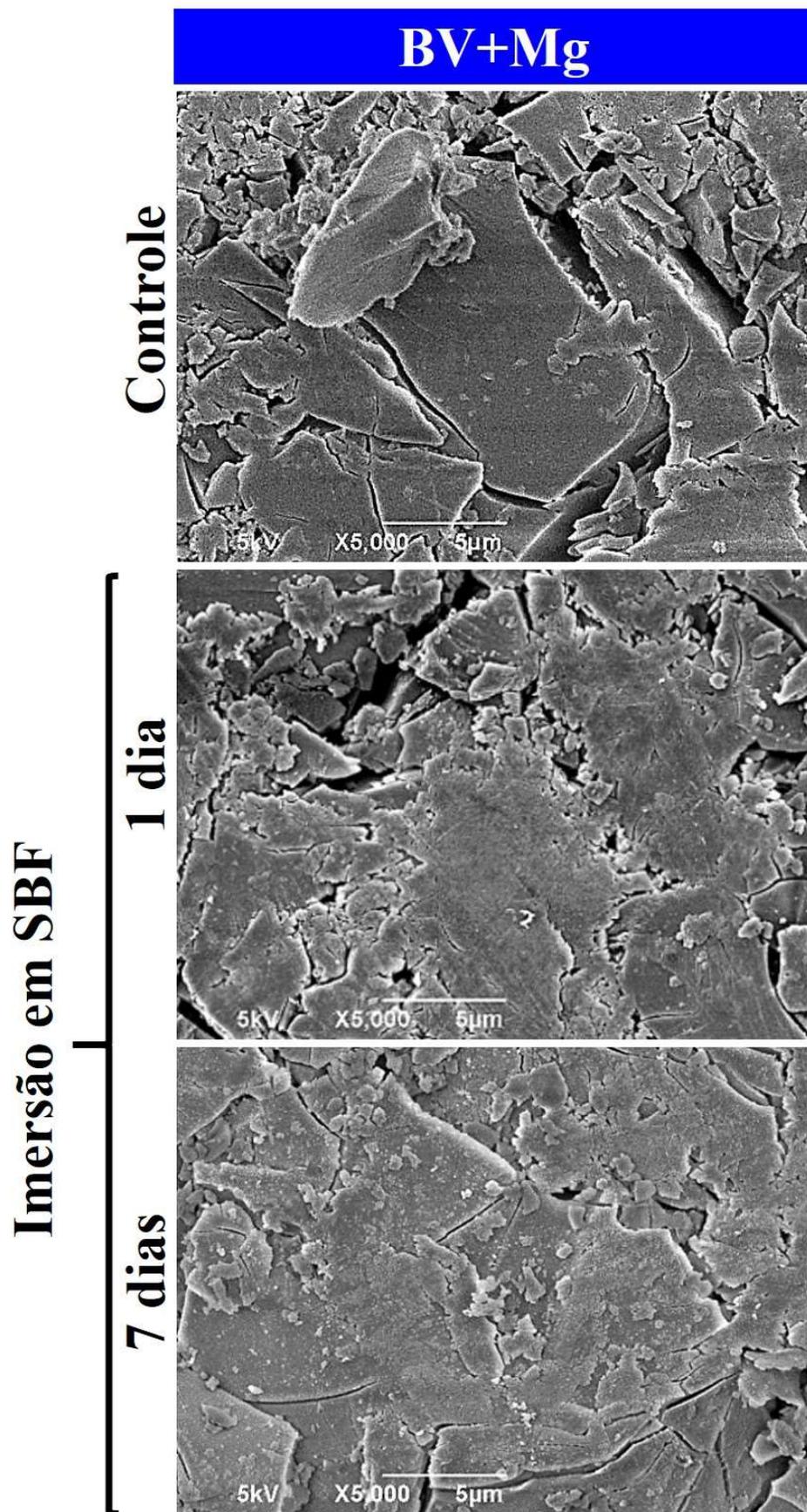


Figura 21. Imagens de MEV da superfície de BV+Mg antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF.

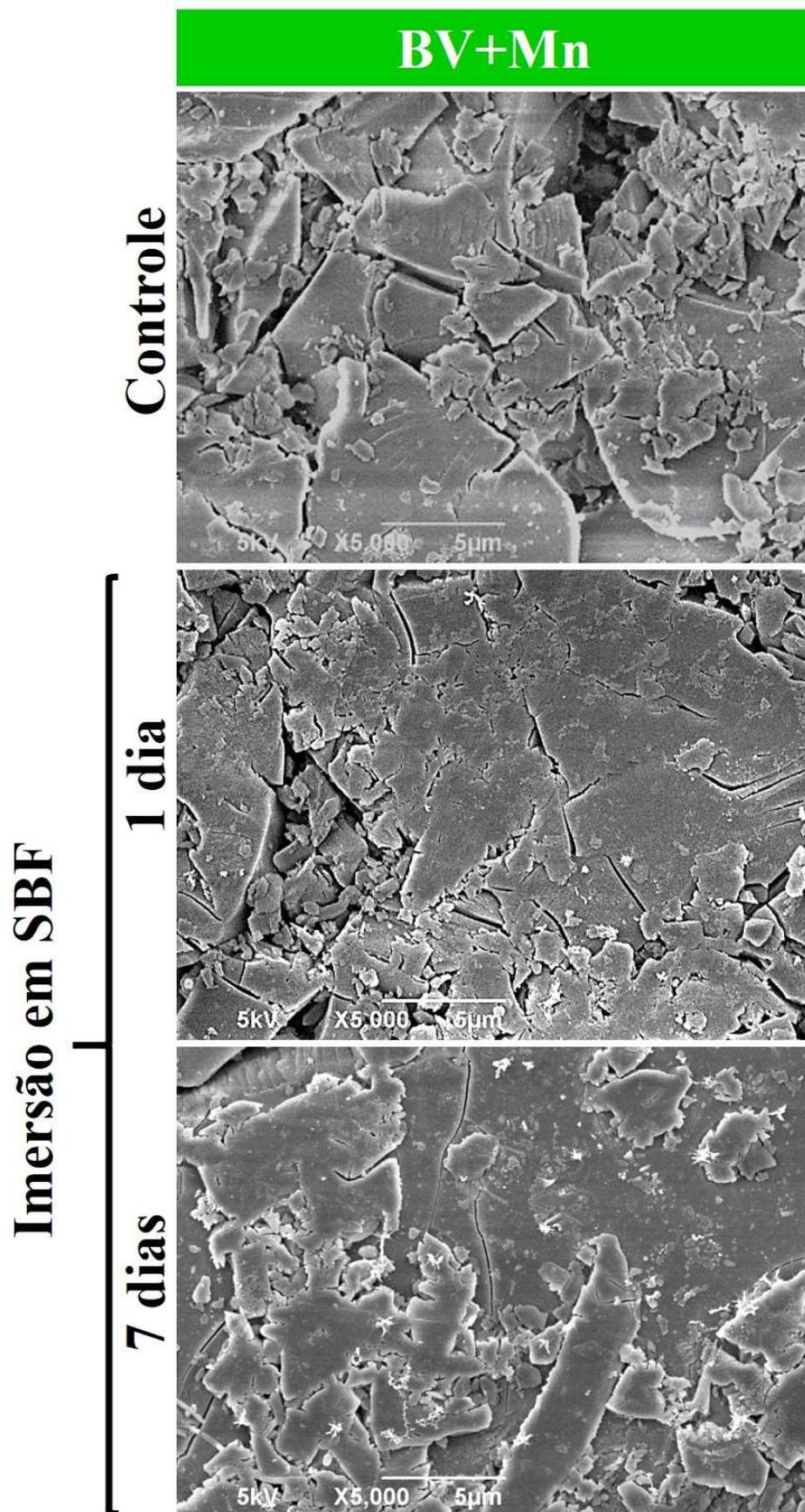


Figura 22. Imagens de MEV da superfície de BV+Mn antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF.

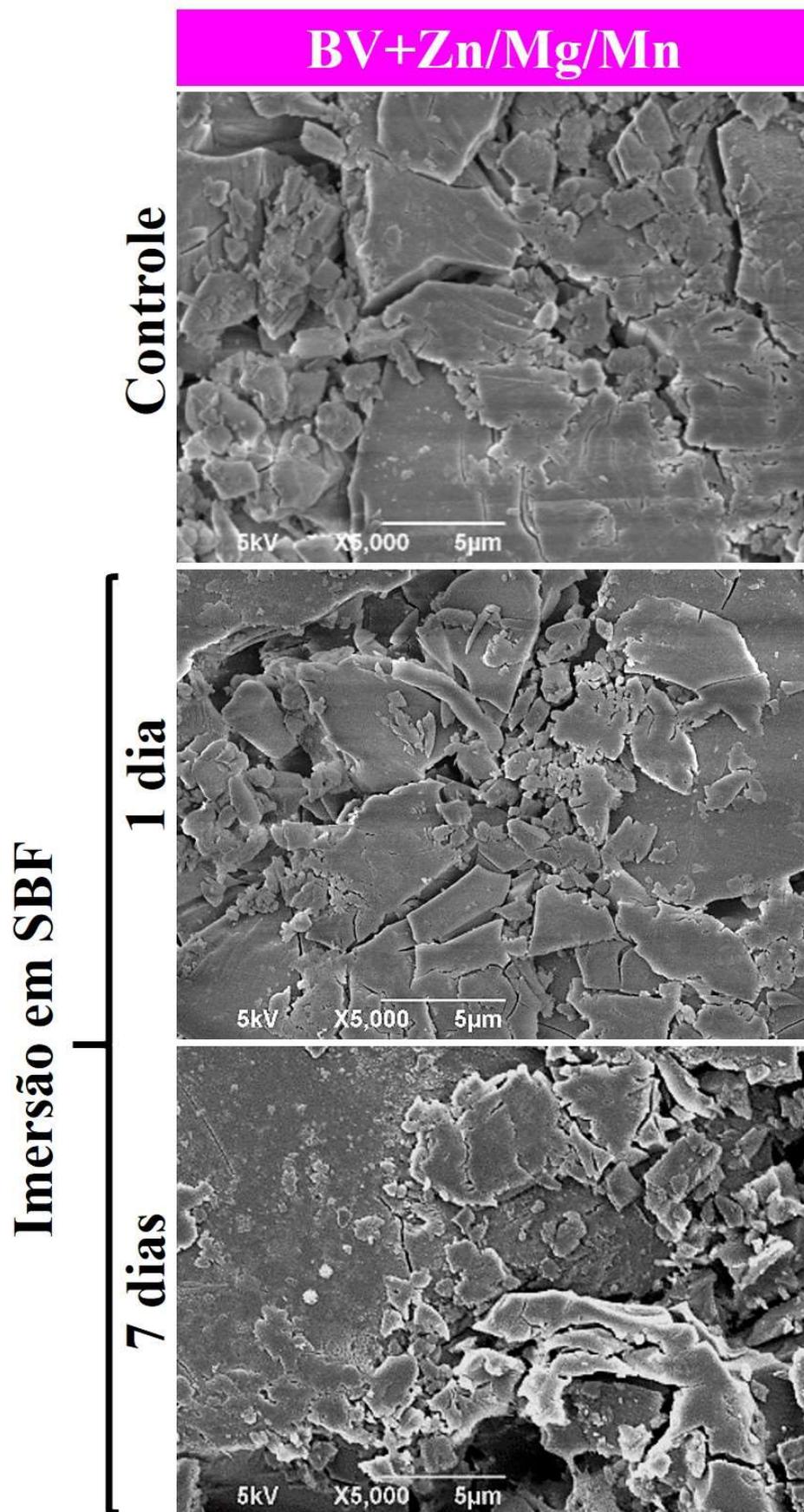


Figura 23. Imagens de MEV da superfície de BV+Zn/Mg/Mn antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF.

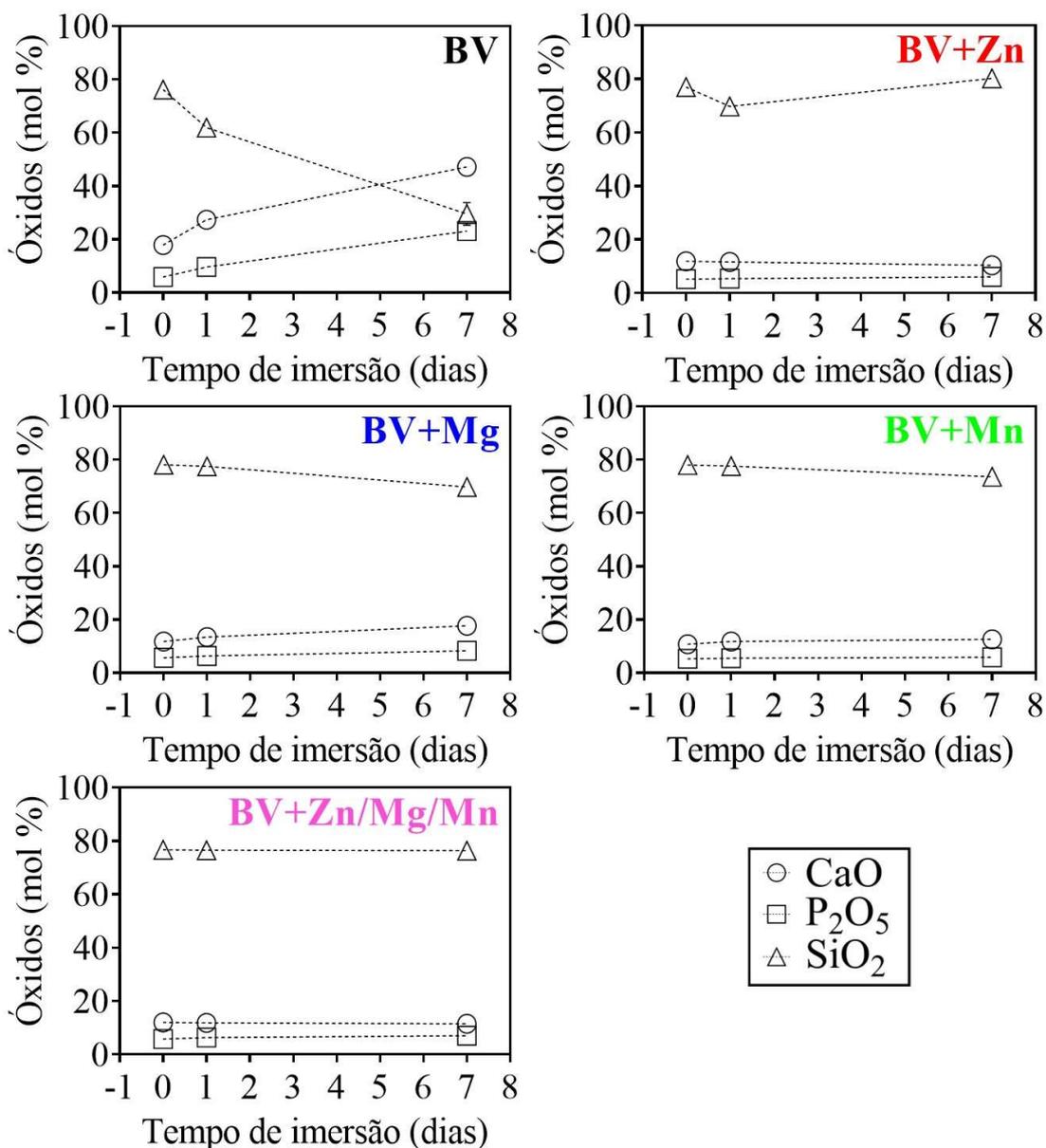


Figura 24. Concentração molar de CaO, P₂O₅ e SiO₂ das superfícies de BV, BV+Zn, BV+Mg, BV+Mn e BV+Zn/Mg/Mn antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF, determinada por EDS.

As análises GIXRD mostraram a formação de picos importantes em torno de 25,9° e 31,8° apenas na amostra de BV (Figura 25). Esses picos são características dos planos de difração da fase cristalina hidroxiapatita (0 0 2) e (2 1 1) [173], e o alargamento do pico indica a formação de nanocristais de hidroxiapatita de baixo ordenamento, típicos de biomineralização em presença de SBF [156, 174]. Portanto, a presença de ZnO, MgO e MnO nas amostras, tanto de forma individual como simultânea, inibiu o processo de precipitação da hidroxiapatita e, conseqüentemente, a bioatividade.

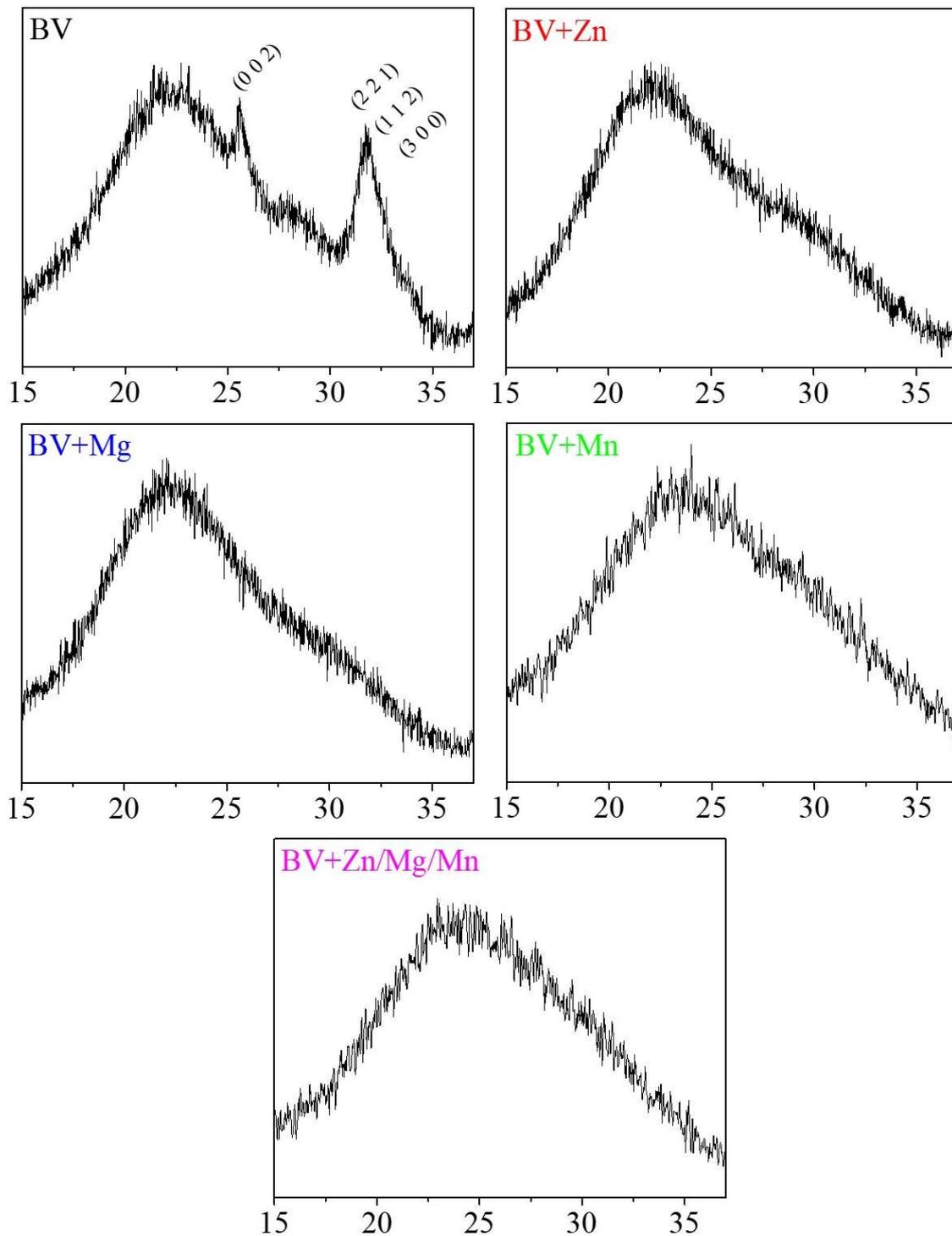


Figura 25. Difração de raios X com incidência rasante (GIXRD) da superfície dos vidros após 7 dias de imersão em SBF. Os principais planos associados a uma fase de hidroxiapatita de baixo ordenamento são descritos nos padrões GIXRD da amostra BV.

Alguns estudos demonstraram que a adição de óxidos metálicos (ZnO, MgO e MnO) em vidros bioativos e a consequente liberação de seus respectivos cátions (Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+}) no meio aquoso (mesmo em baixa concentração) pode inibir a precipitação de apatita [16, 138, 175]. A competição desses elementos na sua forma iônica após a dissolução dos vidros parece interferir nas reações de precipitação da camada superficial da hidroxiapatita [16, 175]. A adição de óxidos metálicos em vidros bioativos também pode reduzir sua dissolução e, conseqüentemente, a formação da camada de hidroxiapatita é prejudicada [33, 125, 139].

A concentração de espécies iônicas liberadas após a imersão de 1 e 7 dias das pastilhas de vidro em meio SBF foi monitorada por ICP-OES (Figura 26). Variações na concentração dos íons durante o teste de bioatividade podem ser usadas como um método indireto para entender os processos que estão ocorrendo na superfície do vidro. Primeiro, como o vidro é parcialmente solúvel, é esperado um aumento inicial nos íons SiO_4^{4-} , Ca^{2+} e PO_4^{3-} na solução. Assim, a camada de apatita pode se formar na superfície do vidro bioativo como consequência da difusão dos íons Ca^{2+} provenientes da dissolução do vidro, bem como do próprio SBF, formando uma camada de sílica amorfa e subsequente migração dos íons PO_4^{3-} e Ca^{2+} para a superfície [138]. Os grupos Si-OH presentes na superfície do vidro bioativo são diretamente responsáveis pela nucleação heterogênea da apatita, uma vez que criam condições para que os íons Ca^{2+} migrem para aquela região [176]. As concentrações de Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} também foram monitoradas para avaliação do papel desses íons em um possível efeito ativador ou inibitório na formação de apatita. Além disso, a relevância em se estudar os produtos de dissolução iônica dos vidros bioativos não está relacionada apenas a formação da camada de hidroxiapatita, mas também pela atuação desses íons como estimulantes do crescimento e diferenciação de osteoblastos em nível genético [177].

A quantidade de SiO_4^{4-} aumentou ao longo do tempo de imersão, especialmente para as amostras que o CaO foi parcialmente substituído por ZnO, MgO e MnO. Além disso, a quantidade de Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} também aumentaram na solução SBF para as amostras contendo os respectivos íons. Como o meio SBF não possui SiO_4^{4-} , Zn^{2+} e Mn^{2+} em sua composição [13], podemos considerar que a detecção desses íons no meio, especialmente o íon SiO_4^{4-} , está associada ao processo de dissolução do vidro. As reações de dissolução começam logo após a imersão do vidro bioativo em SBF pela reação entre a água e as unidades tetraédricas de SiO_4 das cadeias de silicato. A ruptura induzida pela hidratação dessas cadeias de silicato causa a liberação de SiO_4^{4-} solúvel ou mesmo

pequenas cadeias de silicato no meio [34]. A presença do íon Mg^{2+} em todas as amostras ocorre devido à sua presença na composição do meio SBF [13].

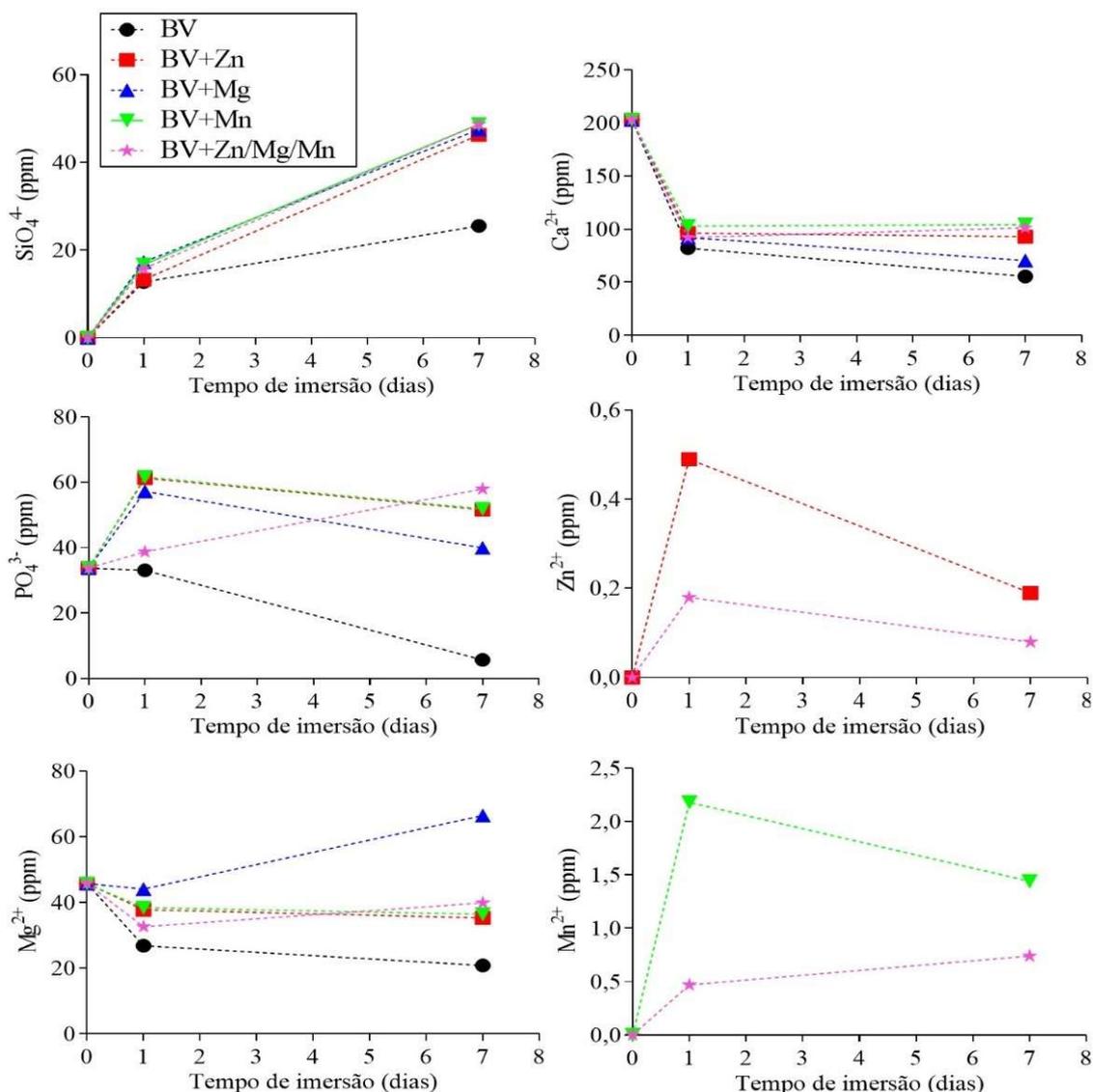


Figura 26. Concentrações de íons SiO_4^{4-} , Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} no meio SBF antes e após a imersão das amostras de vidro por 1 e 7 dias determinada por ICP-OES.

De acordo com a diminuição de T_g (Tabela 5 e Figura 11) e o aumento de NBO (Figura 17), discutidos anteriormente, a presença de ZnO, MgO e MnO contribuiu para o aumento da solubilidade dos vidros. Além disso, a quantidade de Ca^{2+} diminuiu no decorrer do tempo experimental para todas as amostras, mas apenas na amostra BV a quantidade de PO_4^{3-} diminuiu junto com os níveis de Ca^{2+} . Esse achado indica que os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} foram capturados pela superfície da amostra BV para formar uma camada de hidroxiapatita pouco cristalina, como foi observado pelos resultados de MEV (Figuras 19–23), EDS (Figura 24) e GIXRD (Figura 25). Como os íons PO_4^{3-} foram

constantemente liberados nas amostras contendo ZnO, MgO e MnO, pode se sugerir que a presença desses óxidos, ou seja, a presença de seus respectivos cátions na solução SBF, evitou a captura dos íons PO_4^{3-} pela superfície dos vidros bioativos, prejudicando a formação da camada de hidroxiapatita.

Como pode ser observado, a concentração de íons SiO_4^{4-} após 1 dia de imersão é quase a mesma para todas as amostras. No entanto, após 7 dias, a amostra de BV teve uma redução significativa na liberação de SiO_4^{4-} quando comparada às outras amostras. A redução da liberação de íons SiO_4^{4-} vista em BV, ocorre provavelmente devido a barreira que a camada de fosfato de cálcio formada na superfície dessa amostra produz, dificultando, portanto, a dissolução do material. Para outras amostras em que a camada de fosfato de cálcio não foi precipitada a liberação de SiO_4^{4-} continua ocorrendo com o passar dos dias.

Como descrito anteriormente, após imersão no SBF, os grupos siloxanos (Si–O–Si) na superfície do vidro bioativo sofrem hidrólise, formando grupos silanois (Si–OH), com densidade de carga negativa em pH alcalino. Esses grupos podem atrair íons Ca^{2+} , levando à precipitação de uma camada positiva rica em Ca^{2+} . Essa camada positiva atrai ainda íons PO_4^{3-} negativos, formando um fosfato de cálcio amorfo que cristaliza gradualmente em apatita na superfície do vidro bioativo [14]. Os resultados indicam que a presença de ZnO, MgO e MnO inibiu a nucleação de fosfato de cálcio, não interferindo necessariamente na captura de Ca^{2+} pela superfície negativa do vidro bioativo. A biomineralização do fosfato de cálcio é conhecida como um processo de cristalização não clássico, no qual *clusters* ou aglomerados nanométricos de cálcio são formados antes da nucleação eficaz dos blocos de fosfato de cálcio [178, 179]. Dessa forma, os agentes inibitórios podem agir evitando a formação inicial de aglomerados de Ca^{2+} ou até mesmo evitando a cristalização de fosfato de cálcio [180]. Ao que tudo indica, ocorreu a formação de *clusters* de cálcio na superfície das amostras utilizadas nesse estudo, evidenciado pela redução gradual nos níveis de íons Ca^{2+} , contudo a presença dos íons Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} produziu um efeito inibitório na nucleação do fosfato de cálcio.

Estudos apontam o Mg^{2+} como conhecido agente inibidor da biomineralização de fosfato de cálcio [127, 181]. Já foi demonstrado que Mg^{2+} pode atuar retardando a formação de aglomerados de cálcio e também estabilizando a fase amorfa do fosfato de cálcio, evitando sua cristalização ao longo do tempo [126, 182]. Mesmo estando presente em baixa concentração na composição do SBF, os íons Mg^{2+} não interferiram na precipitação de fosfato de cálcio na amostra BV. No entanto, na amostra BV+Mg, sua

concentração aumentou significativamente ao longo do tempo, até provavelmente atingir o limite inibitório, evitando a precipitação. O Zn^{2+} e o Mn^{2+} também são conhecidos por reduzir a bioatividade de vidros bioativos, evitando a precipitação de fosfato de cálcio [107, 138, 175, 183]. De forma similar ao que ocorre com os íons Mg^{2+} , acredita-se que os íons de Zn^{2+} e Mn^{2+} (todos exibindo raios iônicos significativamente menores que os do Ca^{2+}) entram na estrutura dos pré-núcleos de fosfato de cálcio, distorcendo-os e criando uma desordem estrutural que impede o crescimento de cristais de apatita [107, 138, 183, 184]. Nos cristais pré-formados, a adsorção preferencial de Zn^{2+} no plano $(0\ 0\ 0\ 1)$ da hidroxiapatita impede seu crescimento [122].

A substituição parcial de CaO por ZnO, MgO e MnO levou a um aumento na dissolução do vidro, entretanto, resultou na diminuição na precipitação de apatita e, conseqüentemente, da bioatividade. A principal questão levantada neste trabalho de tese é se essa diminuição da bioatividade poderia realmente comprometer o comportamento osteoblástico ou se a presença de Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} em solução compensaria a diminuição da bioatividade ao estimular diretamente as células osteoblásticas, especialmente seus comportamentos de adesão, proliferação e diferenciação.

6.3 INFLUÊNCIA DOS ÍONS Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} NO COMPORTAMENTO OSTEOBLÁSTICO

Para o estudo do comportamento biológico foram usadas células de osteossarcoma humano (MG-63), que tem características de osteoblastos imaturos, uma vez que são particularmente sensíveis às cerâmicas bioativas para regeneração óssea [185]. A adesão celular após o contato de 24 h com os vidros bioativos foi avaliada medindo-se a atividade celular via MTT (Figura 27), conforme descrito no item 5.4.2. Como a proliferação de células MG-63 é considerada desprezível até 24 horas após a semeadura, o percentual de células medidas nas superfícies reflete diretamente a eficiência de adesão em cada amostra. O grupo CTL+, no qual as células foram inoculadas diretamente na placa de cultura e cultivadas em meio DMEM, foi considerado como adesão de 100%. Valores percentuais de adesão maiores que 100% indicam que um número maior de células aderiu na superfície das amostras em relação ao grupo CTL+.

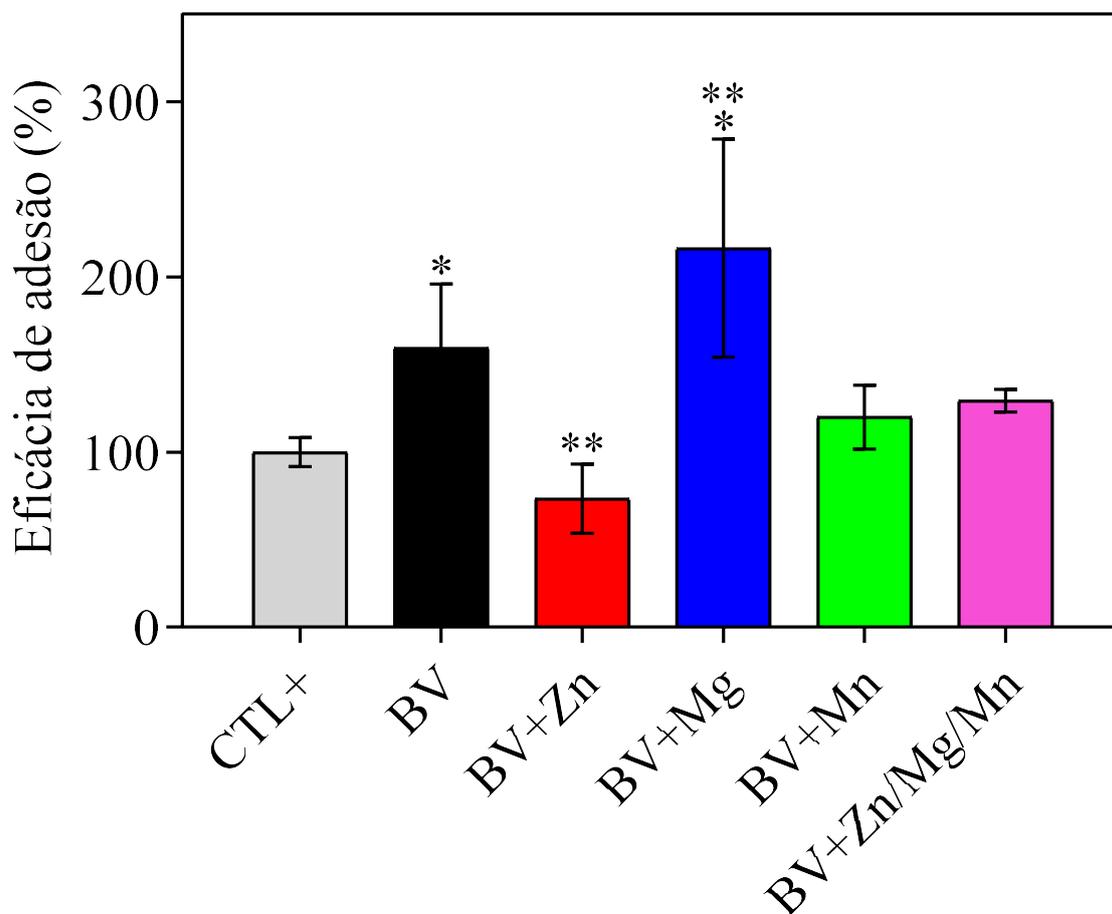


Figura 27. Eficácia de adesão celular *in vitro* nas amostras pelo ensaio MTT com células da linhagem MG-63 após 24 horas de incubação. *diferença significativa ($n = 5; p < 0,05$) em comparação ao grupo CTL+. **diferença significativa ($n = 5; p < 0,05$) em comparação a amostra BV.

Comparando grupo CTL+ com os materiais em estudo, fica demonstrado os grupos contendo as amostras BV e BV+Mg apresentam uma eficácia de adesão significativamente maior, indicando que uma maior quantidade de células aderiu na superfície dessas amostras. A adesão foi ainda mais pronunciada nas amostras BV+Mg do que nas amostras BV. Se a adesão celular observada nas amostras BV ocorreu devido a sua bioatividade (onde ocorreu precipitação efetiva de hidroxiapatita), a maior adesão observada nas amostras BV+Mg deve estar associada à presença de MgO, uma vez que não ocorreu precipitação de hidroxiapatita nessa amostra. Isso significa que, mesmo na ausência de bioatividade, os íons Mg^{2+} presentes nas amostras BV+Mg foram capazes de estimular a adesão dos osteoblastos. Este resultado é extremamente relevante e apropriado por demonstrar que a bioatividade não pode ser inequivocamente associada a uma boa

resposta osteoblástica. O papel dos íons Mg^{2+} nesse caso foi determinante para a maior adesão celular medida nas amostras de BV+Mg. Fazendo a mesma comparação para a eficácia de adesão nos grupos das amostras BV+Zn, BV+Mn e BV+Zn/Mg/Mn, ficou demonstrado que estes não tiveram diferença significativa quando comparadas ao grupo CTL+. Entretanto, o grupo contendo as amostras BV+Zn apresentou uma eficácia de adesão significativamente menor quando comparada ao grupo contendo as amostras BV, indicando que a ausência da camada de hidroxiapatita (sem bioatividade) na amostra ou mesmo à presença dos íons Zn^{2+} na composição de vidro ou no meio aquoso prejudicaram a adesão celular. Os grupos contendo as amostras BV+Mg e BV+Zn/Mg/Mn não apresentaram diferença significativa comparadas ao grupo BV, e dessa forma podemos assumir que mesmo na ausência da camada de hidroxiapatita esses materiais ainda foram eficazes na adesão celular. Assim, os íons Mn^{2+} e a associação dos íons Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} podem estar diretamente envolvidos nos processos biológicos controladores da adesão celular.

Zreiqat *et al.* [101] demonstraram que a adesão de células derivadas de ossos humanos (*human bone-derived cells*, HBDCs) foi aumentada pela presença de íons Mg^{2+} em uma superfície cerâmica modificada com Al_2O_3 . Eles mostraram que as células expressavam níveis significativamente aumentados de receptores de integrinas $\beta 1-$, $\alpha 5\beta 1-$ e $\alpha 3\beta 1-$ em comparação com as células que crescem na ausência de íons Mg^{2+} . Acredita-se que a presença de Mg^{2+} melhore a expressão de proteínas envolvidas na adesão celular, como colágeno tipo 1, FAK, vitronectina e fibronectina [101, 186]. Sabe-se que a adesão celular é extremamente dependente da conformação de proteínas séricas adsorvidas [187]. Recentemente, Huang *et al.* [188] mostraram que uma hidroxiapatita contendo Mg^{2+} poderia gerar um ambiente químico favorável para induzir variações na conformação e/ou orientação de proteínas adsorvidas na superfície, influenciando positivamente o comportamento celular. Eles mostraram que a proteína óssea morfogenética do tipo 2 (BMP-2) preservou amplamente sua estrutura proteica ativa, evidenciada por nós de cisteína (*cysteine-knots*), mais estáveis quando na presença de Mg^{2+} . Os nós de cisteína são compostos de três pontes dissulfeto entrelaçadas com seis resíduos de cisteína no total, e são encontrados em várias proteínas com ampla gama de funções celulares, fornecendo estabilidade à estrutura geral da proteína.

Para avaliar mais claramente o efeito dos íons metálicos sobre o comportamento celular, foram realizados ensaios de proliferação e diferenciação celular durante 7, 14 e 21 dias, e os resultados são mostrados na Figura 28. O grupo contendo amostras de BV

foi usada como controle positivo e comparado com os outros grupos nos quais as amostras tiveram a substituição parcialmente do CaO em sua composição.

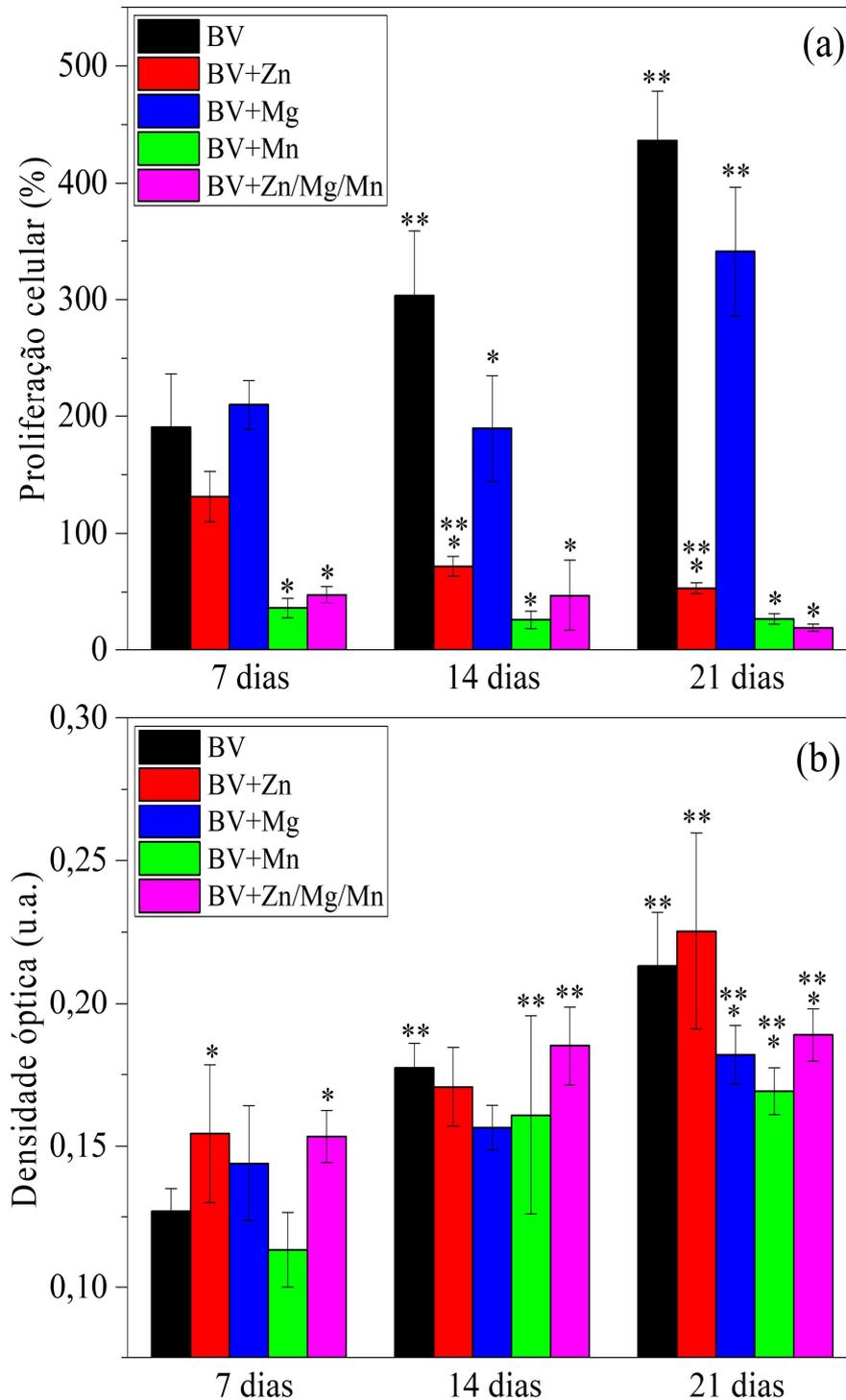


Figura 28. (a) Proliferação e (b) atividade de fosfatase alcalina de células MG-63 cultivadas sobre amostras por 7, 14 e 21 dias. *diferença significativa ($n = 3$; $p < 0,05$) em comparação a amostra BV. **diferença significativa ($n = 3$; $p < 0,05$) em comparação ao tempo experimental anterior.

Após 7 dias de ensaio, a quantidade de formazan produzida pelos osteoblastos cultivados em contato com a superfície das amostras BV, BV+Zn e BV+Mg foi significativamente maior que nas amostras BV+Mn e BV+Zn/Mg/Mn, enquanto a diferença entre o número de células proliferadas sobre as amostras BV, BV+Zn e BV+Mg não foi estatisticamente significativa (Figura 28a). Após 14 dias, somente os grupos contendo as amostras BV e BV+Mg tiveram um aumento significativo no número de células quando comparados aos outros três grupos de amostras.

Mesmo que o Zn^{2+} tenha diminuído a eficácia da adesão após 24 h, após 7 dias a presença desse óxido pareceu não interferir na proliferação celular. No entanto, após 14 e 21 dias, a proliferação foi fortemente comprometida pela presença de Zn^{2+} , exibindo uma curva de proliferação descendente. Já as amostras BV+Mn e BV+Zn/Mg/Mn, mesmo apresentando bons resultados no ensaio de adesão celular, apresentaram forte inibição da proliferação celular. Isso demonstra que a presença de 6% de MnO de forma individual ou simultaneamente associado com ZnO e MgO, na proporção de 2% para cada óxido, prejudicou o desenvolvimento celular, evidenciando um possível efeito citotóxico a longo prazo para com as células. Alguns estudos já demonstraram que o Mn^{2+} pode apresentar citotoxicidade dependendo de sua concentração [189, 190]. Podemos também observar que o efeito inibitório do Mn^{2+} sobre a proliferação celular se sobressai em relação ao Zn^{2+} e Mg^{2+} , tendo em vista que mesmo na menor concentração ele suprimiu a proliferação celular, antagonizando o efeito do Mg^{2+} sobre as células.

Resultados semelhantes foram observados por Westhauser *et al.* [191] ao estudarem duas concentrações diferentes (0,1 e 1 mg mL⁻¹) de nanopartículas de vidro bioativas mesoporosas baseadas no sistema SiO₂-P₂O₅-CaO contendo até 5% em mol de MnO. Na concentração mais baixa, a amostra contendo MnO melhorou a viabilidade das células em comparação com o grupo controle a partir do terceiro dia de ensaio. Entretanto, a concentração de 1 mg mL⁻¹ reduziu a viabilidade celular. No decorrer do ensaio foi visto que a amostra contendo a maior concentração de MnO teve um efeito citotóxico significativo após 14 e 21 dias de ensaio. Os autores ponderam que o efeito citotóxico ocorreu devido a contínua liberação de Mn^{2+} e que, provavelmente, o aumento da concentração de Mn^{2+} prejudicou o desenvolvimento das células ao longo do ensaio.

Miola *et al.* [26] avaliaram a citotoxicidade de vidros bioativos dopados com MnO, usando células de osteossarcoma humano semelhantes a osteoblastos MG-63. Nesse trabalho, um vidro bioativo com composição molar 45% SiO₂, 3% P₂O₅, 26% CaO, 7% MgO, 15% Na₂O, e 4% K₂O (% em mol) foi modificado pela substituição de 0,25

mol% e 0,5 mol% de MgO por MnO. Os resultados demonstram que em concentrações de até 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, os pós de vidro bioativo contendo MnO não apresentaram efeitos citotóxicos, mas exibiram efeitos levemente negativos na proliferação de células MG-63.

A Figura 28b mostra a atividade de ALP das células MG-63 em contato com as amostras. A fosfatase alcalina é usada como um marcador precoce da diferenciação osteoblástica [192], e o aumento nos níveis de ALP indica um maior grau de diferenciação celular [171]. Como pode ser observado, a atividade de ALP cresceu linearmente ao longo do tempo para todos os grupos de amostras. No sétimo dia, a atividade de ALP medida nas amostras BV+Zn e BV+Zn/Mg/Mn foi significativamente maior que nas amostras BV, no entanto, após 14 dias essa diferença não foi mais significativa. Por outro lado, o grupo com as amostras BV+Zn/Mg/Mn teve uma redução significativa de ALP após 21 dias quando comparado ao grupo controle BV. O grupo de amostras BV+Mn foi o que apresentou menor atividade de ALP ao longo dos 21 dias de experimento, mesmo apresentando um aumento significativo ao longo do tempo. O grupo de amostras BV+Mg apresentou valores de ALP crescentes ao longo dos 21 dias, porém quando se observa o tempo experimental de 21 dias a atividade de ALP foi significativamente menor que o grupo de amostras BV. Considerando que a proliferação foi extremamente reduzida nos grupos com as amostras BV+Zn, BV+Mn e BV+Zn/Mg/Mn é possível afirmar que a produção de ALP para as células presentes na superfície desses materiais foi muito mais pronunciada do que nas células presentes na superfície das amostras BV e BV+Mg. Isso significa que as células que estavam em contato com as amostras que continham ZnO e MnO em sua composição provavelmente foram estimuladas pelos íons Zn^{2+} e Mn^{2+} para produzir mais ALP.

Em geral, a atividade da ALP nos osteoblastos é intrinsecamente dependente da proliferação. Por exemplo, os glicocorticoides podem diminuir a proliferação celular enquanto aumentam a atividade da ALP em culturas celulares do tipo osteoblastos [193]. Algumas proteínas extracelulares e íons inorgânicos também podem produzir um comportamento semelhante [194–197]. Em muitos casos, esse comportamento é causado pelo deslocamento das fases de proliferação e diferenciação osteoblástica ao longo do tempo. O processo de maturação dos osteoblastos pode ser dividido em três estágios sequenciais [198, 199]. No primeiro estágio, as células proliferam e expressam fibronectina, colágeno tipo I, receptor 1 de $\text{TGF}\beta$ e osteopontina. No segundo estágio, a proliferação celular para e a diferenciação inicia, produzindo ALP e colágeno tipo I até a completa formação e maturação da matriz extracelular osteóide. Finalmente, o terceiro

estágio, em que a biomineralização do osteóide começa com a deposição de fosfato de cálcio e alta expressão de osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina. Em geral, uma alta atividade de ALP caracterizará a entrada de osteoblastos na fase de maturação osteóide com consequente depleção na proliferação.

Existem muitos fatores que podem avançar na fase de maturação e, conseqüentemente, diminuir a proliferação. O zinco é um cofator conhecido necessário para a atividade da ALP [200]. Esta importante enzima para a formação óssea pode incorporar até quatro Zn^{2+} por molécula. Uma enzima ALP ativa precisa de um mínimo de dois Zn^{2+} por molécula [201]. Assim, a ausência de Zn^{2+} no meio leva a uma regulação negativa da mineralização da matriz extracelular através da inibição da atividade de ALP nos osteoblastos [36]. Portanto, a alta expressão de ALP nas células que estavam em contato com o grupo de amostras BV+Zn indica que o Zn^{2+} estimulou as células a avançarem para a fase de maturação (estágio 2) mais rapidamente do que as células que estavam em contato com as outras amostras. A rápida passagem para a fase de maturação pode ter prejudicado a fase de proliferação celular (estágio 1), como demonstrado pelo ensaio de proliferação. Esse resultado está de acordo com o observado por Hall *et al.* [90], onde o Zn^{2+} aumentou a atividade específica de ALP em células de osteossarcoma humano da linhagem SaOS-2 e MG-63, e nenhum efeito semelhante foi observado para outros elementos estudados, incluindo o Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} .

Sabe-se também que o Zn^{2+} estimula a mineralização das células osteoblásticas aumentando a expressão do RNAm da osteocalcina [202]. Aumenta a função osteogênica ativando as vias de sinalização PKC/MAPK nas células osteoblásticas [203], enquanto antagoniza a ativação do NF-B, uma via necessária para a osteoclastogênese e a supressão da diferenciação dos osteoblastos [92]. O NF-B é usado como via principal pelo RANKL (ativador do receptor do ligante NF-B) e TNF (fator de necrose tumoral) para estimular a osteoclastogênese. De acordo com Kwun *et al.* [36] A deficiência de Zn^{2+} atenua a atividade osteogênica, reduzindo a expressão de Runx2 e, conseqüentemente, leva a uma transcrição decrescente de vários genes específicos para ossos.

O limite do efeito benéfico do Zn^{2+} nos osteoblastos tem sido frequentemente considerado em pesquisas [49, 204]. Wang *et al.* [49] demonstraram que o aumento do teor de ZnO nos vidros bioativos à base de fosfato diminuiu a proliferação enquanto aumentou significativamente a expressão de ALP pelas células MG-63. Sanchez-Salcedo *et al.* [204] estudaram o efeito de duas concentrações de ZnO (4 e 7 mol%) no comportamento dos osteoblastos usando um vidro bioativo mesoporoso à base de sílica

muito semelhante ao utilizado em nosso trabalho. Eles demonstraram que o maior teor de ZnO diminuiu a proliferação celular ao longo do tempo, enquanto aumentou o nível de lactato desidrogenase produzido pelas células, indicando algum nível de citotoxicidade nessa concentração. Por outro lado, a expressão da ALP foi aumentada ao longo do tempo, atingindo um nível bastante comparável às outras condições, especialmente considerando as taxas de proliferação. Pode-se supor que a 6 mol% de ZnO, a diminuição da proliferação observada também refletisse alguma citotoxicidade.

O efeito do Mn^{2+} na diferenciação osteoblástica e na produção da matriz extracelular foi alvo de estudos, porém ainda não existe um consenso. Por exemplo, em um estudo realizado por Zhang *et al.* [205] foi demonstrado que o Mn^{2+} inibe a formação da matriz extracelular e à diferenciação osteogênica de células mesenquimais do estroma da medula óssea (BMSCs), e que a concentração e o tempo de incubação são fatores-chave para mudar os efeitos biológicos do Mn^{2+} de dano para proteção. Lüthen *et al.* [106] observaram que o aumento da concentração de íons Mn^{2+} reduziu a proliferação e produziu alterações no fenótipo de células MG-63 (morfologia fusiforme), além de afetar a diferenciação celular, evidenciado pela diminuição da expressão de mRNA da ALP e colágeno tipo 1 (Col 1). Por outro lado, Miola *et al.* [26] demonstraram que células MG-63 cultivadas em contato com pó de vidros bioativos dopados com MnO tiveram uma boa proliferação, acompanhado de um aumento nos padrões de expressão gênica de ALP, BMP-2 e BPM-7. Um aumento na expressão desses marcadores é um forte indicativo que o processo de diferenciação celular está em curso. Barrioni *et al.* [139] observaram que amostras de vidro bioativo contendo MnO levaram um aumento na expressão de ALP e consequentemente influenciaram o processo de diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs) ao longo de uma via óssea, enquanto as hMSCs expostas ao vidro livre de MnO não se diferenciaram, indicando a importância do Mn^{2+} no processo de diferenciação. Westhauser *et al.* [191] demonstraram que células cultivadas em contato com nanopartículas de vidro bioativo contendo 5% de MnO em substituição ao CaO tiveram um aumento na atividade de ALP e na expressão dos genes da osteopontina e osteocalcina, importantes na formação de matriz extracelular óssea. Isso demonstra que mesmo induzindo uma baixa proliferação celular o Mn^{2+} pode atuar como promotor da diferenciação celular, não podendo ser descartado um possível efeito citotóxico desse íon sobre as células. Porém, estudos que avaliem o limite do efeito benéfico do Mn^{2+} em osteoblastos ainda são escassos na literatura.

Existem vários marcadores importantes da diferenciação de osteoblastos muito mais específicos que a ALP. No entanto, a atividade da ALP ainda é amplamente utilizada por muitos pesquisadores em todo o mundo como um teste de rastreamento simples e rápido para definir os estágios de diferenciação dos osteoblastos, especialmente para células de revestimento já comprometidas com o fenótipo osteoblástico. A medida da atividade da ALP torna nossos achados facilmente comparáveis com muitos outros trabalhos focados na biocompatibilidade osteoblástica.

Imagens de MEV das células cultivadas em contato com as amostras (Figuras 29–33) confirmam os resultados do ensaio de proliferação celular mencionado acima. Foram observadas células com membrana citoplasmática estendida pela superfície das amostras BV e BV+Mg desde o 7º dia de cultura, chegando à confluência no 21º dia. Em BV+Zn, BV+Mn e BV+Zn/Mg/Mn as células aderiram na superfície das amostras, entretanto, tiveram uma baixa proliferação ao longo dos dias. A morfologia das células em contato com BV+Zn, BV+Mn e BV+Zn/Mg/Mn apresentou-se bem diferente das células em contato com BV e BV+Mg. Nesse caso, uma camada muito densa de células MG-63 foi observada nas superfícies BV e BV+Mg. No entanto, o número de células encontradas nas superfícies de BV+Zn, BV+Mg e BV+Zn/Mg/Mn foi extremamente baixo e com diferenças na morfologia celular. Nas amostras BV e BV+Mg, foram verificadas células espraiadas que atingiam confluência, sugerindo comportamento adequado e expressão de fenótipo. Na amostra BV+Zn, muitas células tiveram dificuldade em se espraiar pela superfície, indicando um comportamento anormal na superfície. Conforme observado para o comportamento de adesão, há uma incompatibilidade entre os resultados esperados associados à bioatividade das amostras e os observados para a proliferação celular a longo prazo.

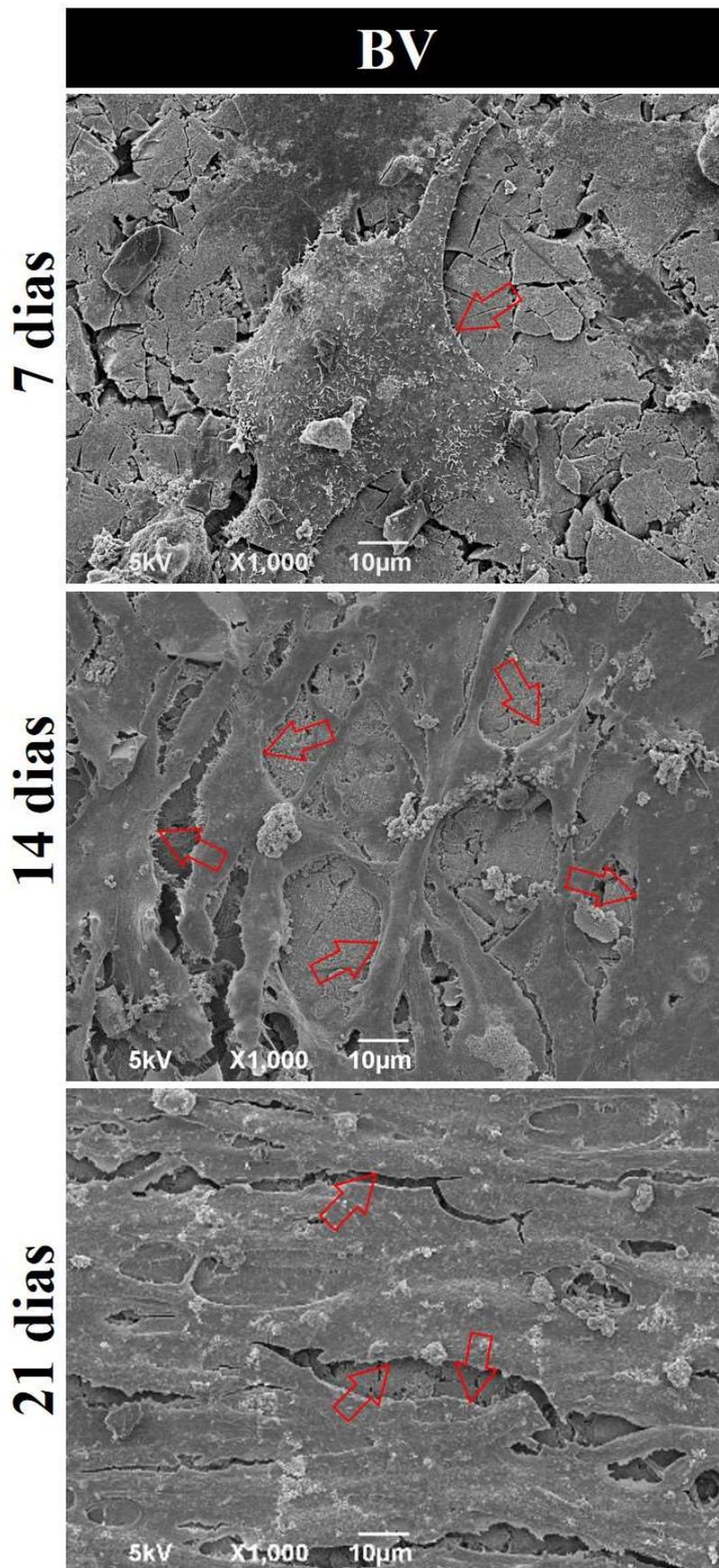


Figura 29. MEV das células MG-63 na superfície da amostra BV após 7, 14 e 21 dias de cultura. Setas vermelhas indicam a posição de algumas células.

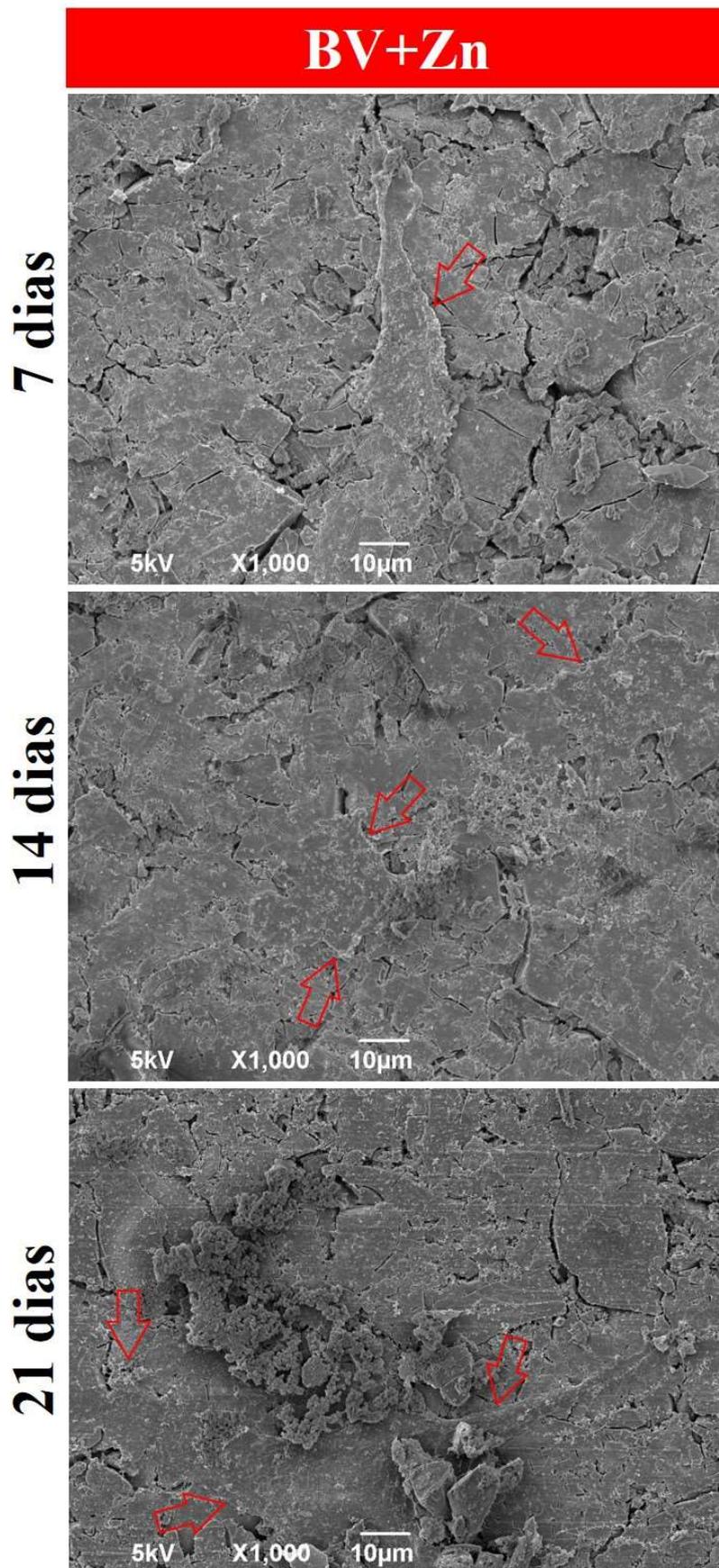


Figura 30. MEV das células MG-63 na superfície da amostra BV+Zn após 7, 14 e 21 dias de cultura. Setas vermelhas indicam a posição de algumas células.

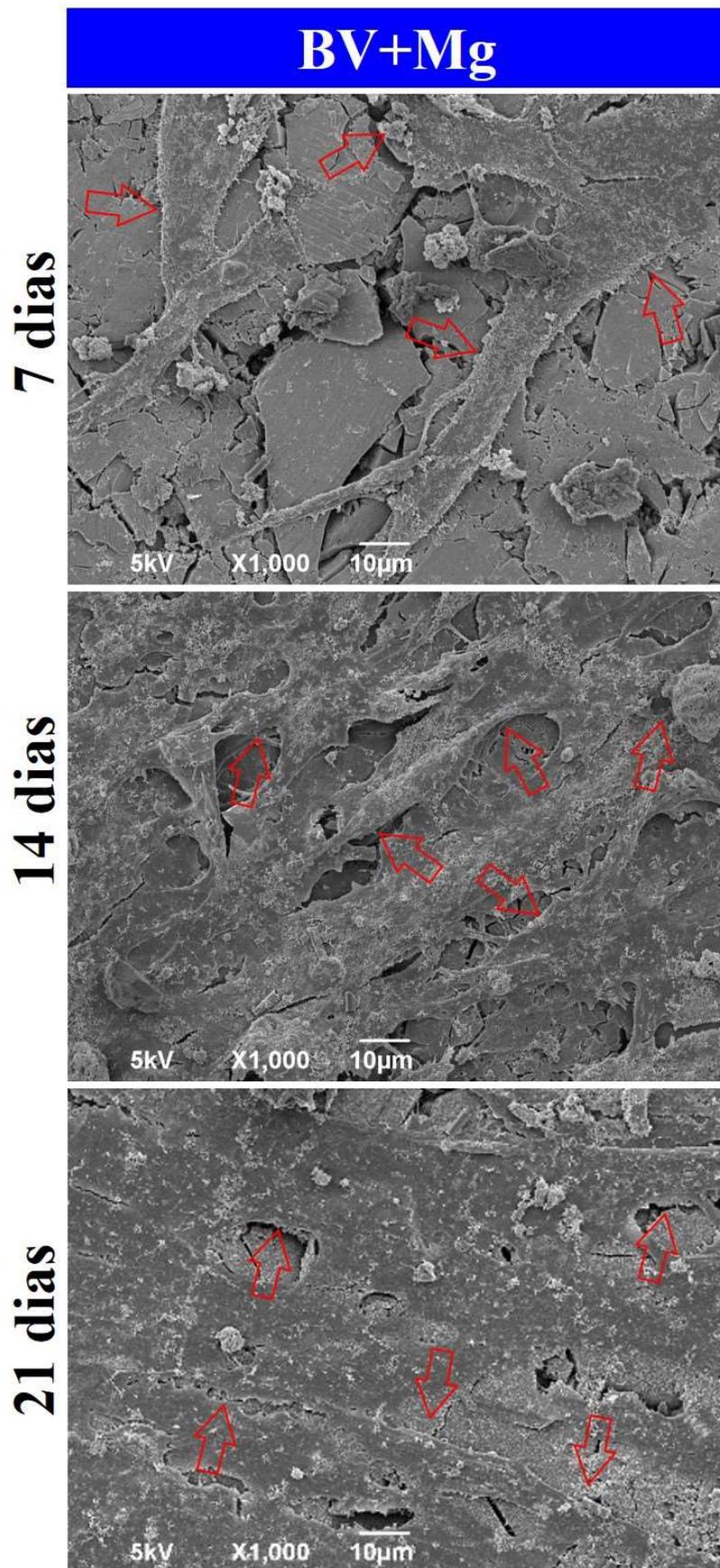


Figura 31. MEV das células MG-63 na superfície da amostra BV+Mg após 7, 14 e 21 dias de cultura. Setas vermelhas indicam a posição de algumas células.

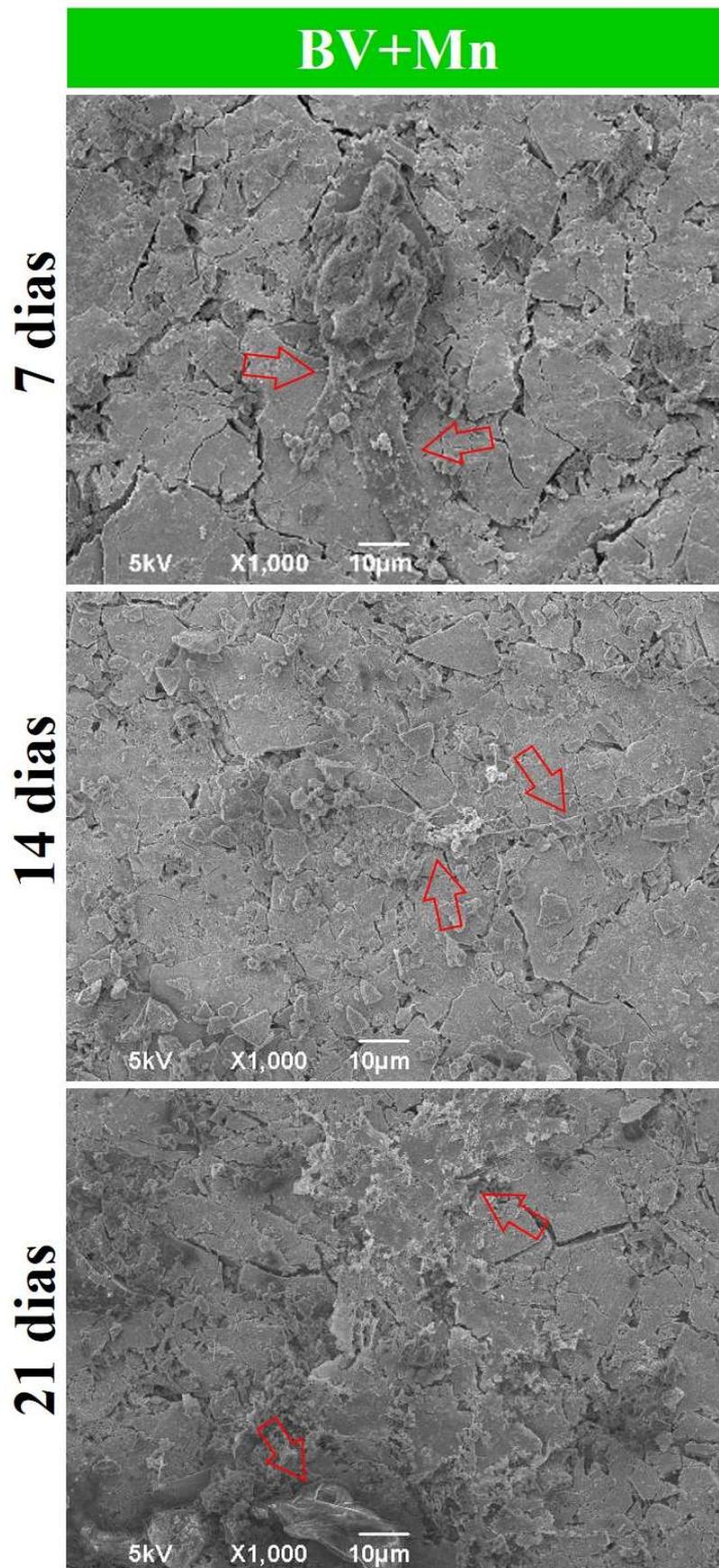


Figura 32. MEV das células MG-63 na superfície da amostra BV+Mn após 7, 14 e 21 dias de cultura. Setas vermelhas indicam a posição de algumas células.

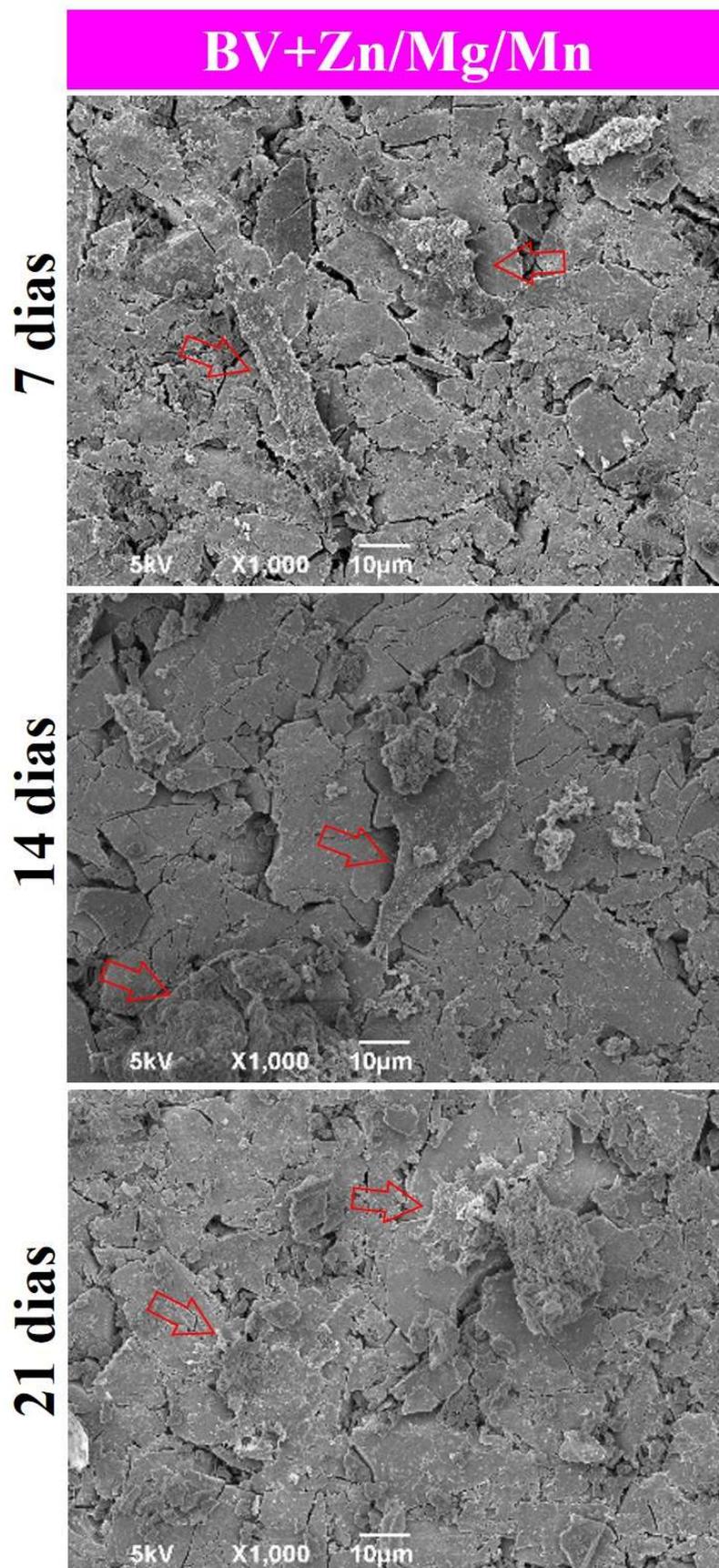


Figura 33. MEV das células MG-63 na superfície da amostra BV+Zn/Mg/Mn após 7, 14 e 21 dias de cultura. Setas vermelhas indicam a posição de algumas células.

Como discutido na seção de introdução, Belucci *et al.* [32] levantaram uma questão importante sobre a eficácia do ensaio de bioatividade para prever o comportamento celular. Foi demonstrado que a bioatividade no SBF de um compósito de vidro bioativo/hidroxiapatita aumentou com a quantidade de vidro. Por outro lado, o comportamento de fibroblastos embrionários de murinos (NIH/3T3) foi estimulado pelas maiores quantidades de hidroxiapatita no compósito. Eles também sugeriram que a alta rugosidade da superfície da amostra com maior quantidade de hidroxiapatita, juntamente com sua microporosidade difusa, poderia favorecer a ligação e proliferação celular. A topografia é muito conhecida por estimular o comportamento celular, apresentando em certas condições um papel mais importante que a química de superfície sob o controle do comportamento celular [206, 207]. Por esse motivo, quando possível, é muito importante tentar isolar o efeito topográfico daqueles causados pela química do material [207, 208], especialmente para materiais com composições complexas. Para os materiais em estudo, a rugosidade média medida na superfície das amostras não apresentou diferenças significativas (Figura 34), o que permite afirmar que o comportamento biológico observado nas amostras provavelmente foi promovido por suas diferenças químicas, principalmente pela presença de ZnO, MgO e Mn. Além disso, células de osteossarcoma semelhantes a osteoblastos humanos (MG-63) foram usadas nos ensaios. Essas células são consideradas mais adequadas para testar a regeneração óssea de cerâmicas bioativas do que os fibroblastos usados nos ensaios de Belucci *et al.* [32].

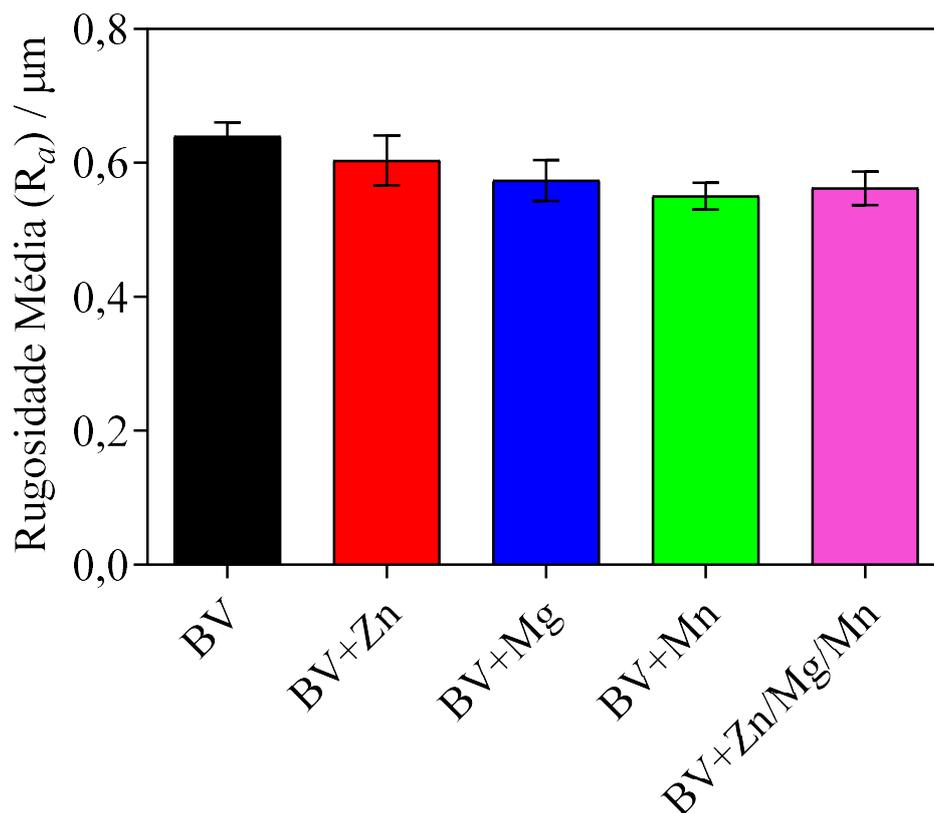


Figura 34. Rugosidade média (R_a) das pastilhas de vidro tratadas termicamente a 700°C.

No geral, a substituição de CaO por ZnO, MnO e os três óxidos em associação inibiram a bioatividade ao mesmo tempo em que induziram um baixo desempenho na proliferação celular e uma alta atividade de ALP (Tabela 7). O MgO também inibiu a bioatividade, mas inversamente ao observado nas outras amostras, induziu uma alta adesão e proliferação celular e uma atividade moderada de ALP, semelhante à BV.

Tabela 7. Resumo dos efeitos promovidos pela substituição parcial de CaO por ZnO, MgO e MnO na estrutura do vidro sobre a bioatividade, adesão, proliferação e diferenciação de células MG-63.

Amostras	Propriedades			
	Bioatividade	Adesão	Proliferação	Diferenciação
BV	↑	±	↑	↑
BV+Zn	–	↓	↓	↑
BV+Mg	–	↑	↑	±
BV+Mn	–	±	↓	↑
BV+Zn/Mg/Mn	–	±	↓	↑

↑ Alta ↓ Baixa ± Moderada – Ausente

Todas essas evidências reforçam a tese defendida por Bellucci *et al.* [32] sobre a importância da interpretação da bioatividade em SBF frente a outros ensaios biológicos, especialmente quando a intenção é entender o papel de um íon em particular ou composição química específica, esses fatores devem ser isolados de outras variáveis também envolvidas no controle celular. Já foi demonstrado em estudos anteriores [34, 156, 173, 174] que a presença simultânea de diferentes oligoelementos e em diferentes concentrações pode causar efeitos sinérgicos e antagônicos no comportamento físico-químico e biológico de biocerâmicas. Portanto, entendemos que a combinação de diferentes oligoelementos em diferentes quantidades pode produzir respostas celulares distintas, interferindo ainda mais na diferenciação dos osteoblastos e, conseqüentemente, na biocompatibilidade dos vidros bioativos. Por meio dos resultados encontrados nesse estudo e uma ampla pesquisa na literatura existente é possível concluir que para prever o efeito *in vivo* de materiais de composição complexa é necessário um estudo aprofundado das propriedades físico-químicas e a resposta celular *in vitro*, uma vez que diversos estímulos são capazes de produzir influência sobre as células.

CAPÍTULO 7
CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a substituição parcial do CaO por ZnO, MgO e MnO reduziu a T_g e T_c dos vidros em função do aumento de NBO. O vidro bioativo em que o CaO foi substituído por MgO teve sua bioatividade em SBF inibida ao mesmo tempo em que apresentou um alto desempenho nos ensaios de adesão e proliferação celular e uma atividade moderada de ALP. Para os vidros bioativos em que o CaO foi substituído por ZnO, MnO ou os três óxidos em associação, também tiveram a bioatividade inibida, mas inversamente ao MgO, esses outros materiais induziram uma baixa proliferação celular e uma alta atividade de ALP. Portanto, embora haja uma importância histórica do ensaio de bioatividade proposto por Kokubo como tentativa de prever a biocompatibilidade de vidros bioativos, o advento de novas biocerâmicas enriquecidas com oligoelementos demonstra que a formação de apatita não é o único critério para definir a biocompatibilidade de um material. Como alguns oligoelementos são capazes de interferir tanto na precipitação da apatita quanto no comportamento celular, é essencial interpretar a biocompatibilidade não apenas como a capacidade resultante de induzir a formação de apatita, mas também pelo efeito direto de cada oligoelemento no metabolismo celular. Os resultados demonstram que a bioatividade pode ser considerada uma propriedade secundária para prever a biocompatibilidade *in vitro* de biomateriais de composição complexa, e fornecem motivação para a realização de testes *in vivo*, que poderão contribuir com resultados mais sólidos em relação à biomineralização. Além disso, o mecanismo de ação de cada elemento incluído na composição do material deve ser elucidado por análises físico-químicas.

CAPÍTULO 8
PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS
FUTUROS

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram a necessidade de aprofundamento nos temas seguintes:

- Investigar a diferenciação dos osteoblastos por meio de marcadores mais específicos, como osteocalcina, osteopontina e colágeno tipo I, até que ocorra o processo de biomineralização, para melhor avaliar outros aspectos em que a bioatividade e biocompatibilidade celular podem seguir caminhos distintos;
- Sintetizar materiais com diferentes proporções de ZnO, MgO e MnO afim de avaliar os efeitos físico-químicos e respostas celulares dependentes da concentração;
- Avaliar os efeitos da inclusão de outros óxidos de importância biológica, como o SrO [209], CuO [210] e BO [211], no modelo inicial proposto nesse trabalho, aumentando a complexidade composicional dos sistemas.

CAPÍTULO 9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WU, T., CHENG, N., XU, C. *et al.* “The effect of mesoporous bioglass on osteogenesis and adipogenesis of osteoporotic BMSCs”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 104, pp. 3004–3014, 2016.
- [2] SHANKHWAR, N., KUMAR, M., MANDAL, B.B. *et al.* “Novel polyvinyl alcohol-bioglass 45S5 based composite nanofibrous membranes as bone scaffolds”, *Materials Science and Engineering C*, v. 69, pp. 1167–1174, 2016.
- [3] WU, X., MENG, G., WANG, S. *et al.* “Zn and Sr incorporated 64S bioglasses: Material characterization, in-vitro bioactivity and mesenchymal stem cell responses”, *Materials Science and Engineering C*, v. 52, pp. 242–250, 2015.
- [4] HU, Q., LI, Y., MIAO, G. *et al.* “Size control and biological properties of monodispersed mesoporous bioactive glass sub-micron spheres”, *RSC Adv.*, v. 4, pp. 22678–22687, 2014.
- [5] GERHARDT, L., BOCCACCINI, A.R. “Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *Materials*, v. 3, pp. 3867–3910, 2010.
- [6] RAVARIAN, R., MOZTARZADEH, F., HASHJIN, M.S. *et al.* “Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite”, *Ceramics International*, v. 36, pp. 291–297, 2010.
- [7] LIU, Y., WANG, G., CAI, Y. *et al.* “In vitro effects of nanophase hydroxyapatite particles on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.”, *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, v. 90, pp. 1083–1091, 2009.
- [8] CHEN, Q.Z., LI, Y., JIN, L.Y. *et al.* “A new sol-gel process for producing Na₂O-containing bioactive glass ceramics”, *Acta Biomaterialia*, v. 6, pp. 4143–4153, 2010.
- [9] VERNÈ, E., FERRARIS, S., CASSINELLI, C. *et al.* “Surface functionalization of Bioglass® with alkaline phosphatase”, *Surface and Coatings Technology*, v. 264, pp. 132–139, 2015.
- [10] BARRÈRE, F., MAHMOOD, T.A., DE GROOT, K. *et al.* “Advanced biomaterials

- for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions”, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, v. 59, pp. 38–71, 2008.
- [11] MA, J., CHEN, C.Z., WANG, D.G. *et al.* “Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of magnesium-doped sol-gel glass and glass-ceramics”, *Ceramics International*, v. 37, pp. 1637–1644, 2011.
- [12] KOKUBO, T., KUSHITANI, H., SAKKA, S. *et al.* “Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 24, pp. 721–734, 1990.
- [13] KOKUBO, T., TAKADAMA, H. “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?”, *Biomaterials*, v. 27, pp. 2907–2915, 2006.
- [14] BUENO, E.M., GLOWACKI, J. “Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration”, *Nature Reviews Rheumatology*, v. 5, pp. 685–697, 2009.
- [15] JONES, J.R., BRAUER, D.S., HUPA, L. *et al.* “Bioglass and Bioactive Glasses and Their Impact on Healthcare”, *International Journal of Applied Glass Science*, v. 7, pp. 423–434, 2016.
- [16] BALAMURUGAN, A., BALOSSIER, G., KANNAN, S. *et al.* “Development and in vitro characterization of sol-gel derived CaO-P2O5-SiO2-ZnO bioglass”, *Acta Biomaterialia*, v. 3, pp. 255–262, 2007.
- [17] DIETRICH, E., OUDADESSE, H., LUCAS-GIROT, A. *et al.* “In vitro bioactivity of melt-derived glass 46S6 doped with magnesium”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 88, pp. 1087–1096, 2009.
- [18] EL-KADY, A.M., ALI, A.F. “Fabrication and characterization of ZnO modified bioactive glass nanoparticles”, *Ceramics International*, v. 38, pp. 1195–1204, 2012.
- [19] HENCH, L.L., POLAK, J.M. “Third-generation biomedical materials” , *Science*, v. 295, pp. 1014–1017, 2002.
- [20] JELL, G., STEVENS, M.M. “Gene activation by bioactive glasses”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 17, pp. 997–1002, 2006.

- [21] ZAHID, S., SHAH, A.T., JAMAL, A. *et al.* “Biological behavior of bioactive glasses and their composites”, *RSC Advances*, v. 6, pp. 70197–70214, 2016.
- [22] JONES, J.R. “Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids”, *Acta Biomaterialia*, v. 23, pp. S53–S82, 2015.
- [23] LEI, B., CHEN, X., WANG, Y. *et al.* “Surface nanoscale patterning of bioactive glass to support cellular growth and differentiation”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 94, pp. 1091–1099, 2010.
- [24] CHITRA, S., BARGAVI, P., BALAKUMAR, S. “Effect of microwave and probe sonication processes on sol-gel-derived bioactive glass and its structural and biocompatible investigations”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 108, pp. 143–155, 2020.
- [25] HOPPE, A., GÜLDAL, N.S., BOCCACCINI, A.R. “A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics.”, *Biomaterials*, v. 32, pp. 2757–2774, 2011.
- [26] MIOLA, M., BROVARONE, C.V., MAINA, G. *et al.* “In vitro study of manganese-doped bioactive glasses for bone regeneration”, *Materials Science and Engineering C*, v. 38, pp. 107–118, 2014.
- [27] MOURIÑO, V., CATTALINI, J.P., BOCCACCINI, A.R. “Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments”, *Journal of The Royal Society Interface*, v. 9, pp. 401–419, 2012.
- [28] SCHMITZ, S.I., WIDHOLZ, B., ESSERS, C. *et al.* “Superior biocompatibility and comparable osteoinductive properties: Sodium-reduced fluoride-containing bioactive glass belonging to the CaO-MgO-SiO₂ system as a promising alternative to 45S5 bioactive glass”, *Bioactive Materials*, v. 5, pp. 55–65, 2020.
- [29] SODERLING, E., HERBST, K., LARMAS, E. *et al.* “Protein adsorption to a bioactive glass with special reference to pre-corrosion”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 31, pp. 525–531, 1996.

- [30] ZHENG, K., KAPP, M., BOCCACCINI, A.R. “Protein interactions with bioactive glass surfaces: A review”, *Applied Materials Today*, v. 15, pp. 350–371, 2019.
- [31] KOKUBO, T. “Bioactive glass ceramics: properties and applications”, *Biomaterials*, v. 12, pp. 155–163, 1991.
- [32] BELLUCCI, D., SALVATORI, R., ANESI, A. *et al.* “SBF assays, direct and indirect cell culture tests to evaluate the biological performance of bioglasses and bioglass-based composites: Three paradigmatic cases”, *Materials Science and Engineering: C*, v. 96, pp. 757–764, 2019.
- [33] CACCIOTTI, I. “Bivalent cationic ions doped bioactive glasses: the influence of magnesium, zinc, strontium and copper on the physical and biological properties”, *Journal of Materials Science*, v. 52, pp. 8812–8831, 2017.
- [34] LÁZARO, G.S., SANTOS, S.C., RESENDE, C.X. *et al.* “Individual and combined effects of the elements Zn, Mg and Sr on the surface reactivity of a SiO₂·CaO·Na₂O·P₂O₅ bioglass system”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 386, pp. 19–28, 2014.
- [35] GOEL, A., KAPOOR, S., TILOCCA, A. *et al.* “Structural role of zinc in biodegradation of alkali-free bioactive glasses”, *Journal of Materials Chemistry B*, v. 1, pp. 3073–3082, 2013.
- [36] KWUN, I.S., CHO, Y.E., LOMEDA, R.A.R. *et al.* “Zinc deficiency suppresses matrix mineralization and retards osteogenesis transiently with catch-up possibly through Runx 2 modulation”, *Bone*, v. 46, pp. 732–741, 2010.
- [37] FU, X., LI, Y., HUANG, T. *et al.* “Runx2/Osterix and Zinc Uptake Synergize to Orchestrate Osteogenic Differentiation and Citrate Containing Bone Apatite Formation”, *Advanced Science*, v. 5, pp. 1–10, 2018.
- [38] LANG, C., MURGIA, C., LEONG, M. *et al.* “Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation”, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 292, pp. L577–L584, 2007.

- [39] ABENDROT, M., KALINOWSKA-LIS, U. “Zinc-containing compounds for personal care applications”, *International Journal of Cosmetic Science*, v. 40, pp. 319–327, 2018.
- [40] YAMASAKI, Y., YOSHIDA, Y., OKAZAKI, M. *et al.* “Synthesis of functionally graded MgCO₃ apatite accelerating osteoblast adhesion”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 62, pp. 99–105, 2002.
- [41] LIM, S.S., KHO, S.W., ANG, N.L.H. *et al.* “The Influence of Mg²⁺ Ions on the In Vitro Efficacy of Chitosan-Titanium Dioxide Nanotubes (CTNTs) Scaffolds”, *Advances in Polymer Technology*, v. 2019, pp. 1–10, 2019.
- [42] RUDE, R.K., SINGER, F.R., GRUBER, H.E. “Skeletal and Hormonal Effects of Magnesium Deficiency”, *Journal of the American College of Nutrition*, v. 28, pp. 131–141, 2009.
- [43] NOTOMI, T., KUNO, M., HIYAMA, A. *et al.* “Role of lysosomal channel protein TPC2 in osteoclast differentiation and bone remodeling under normal and low-magnesium conditions”, *Journal of Biological Chemistry*, v. 292, pp. 20998–21010, 2017.
- [44] ŠUPOVÁ, M. “Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review”, *Ceramics International*, v. 41, pp. 9203–9231, 2015.
- [45] BOANINI, E., GAZZANO, M., BIGI, A. “Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature”, *Acta Biomaterialia*, v. 6, pp. 1882–1894, 2010.
- [46] LEE, I., SHIN, S.H., FOROUTAN, F. *et al.* “Effects of magnesium content on the physical, chemical and degradation properties in a MgO-CaO-Na₂O-P₂O₅ glass system”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 363, pp. 57–63, 2013.
- [47] GENTLEMAN, E., FREDHOLM, Y.C., JELL, G. *et al.* “Biomaterials The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro”, *Biomaterials*, v. 31, pp. 3949–3956, 2010.
- [48] TABIA, Z., EL MABROUK, K., BRICHA, M. *et al.* “Mesoporous bioactive glass

- nanoparticles doped with magnesium: drug delivery and acellular in vitro bioactivity”, *RSC Advances*, v. 9, pp. 12232–12246, 2019.
- [49] WANG, Y., ZHU, C., PARSONS, A. *et al.* “Effects of ZnO addition on thermal properties, degradation and biocompatibility of P45Mg24Ca16Na(15-x)Znx glasses”, *Biomedical Glasses*, v. 5, pp. 53–66, 2019.
- [50] AKERMAN, M. “Natureza , Estrutura e Propriedades do Vidro”, pp. 1–37, 2000.
- [51] ALVES, O.L., GIMENEZ, I.F., MAZALI, I.O. “Vidros”, *Cadernos Temáticos-Química Nova Na Escola*, v. 2, pp. 13–24, 2001.
- [52] LEBEDEV A.A. “On the polymorphism and annealing of glass”, *Trudy Gos. Opt. Inst.*, v. 2, pp. 1–20, 1921.
- [53] NARDI, R.P.R.D. “*Vidros e vitrocerâmicas luminescentes de fluorofosfatos de chumbo e tungstênio*”, Dissertação de M.Sc., Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, Brasil, 2016.
- [54] GUPTA, P.K. “Non-crystalline solids: glasses and amorphous solids”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 195, pp. 158–164, 1996.
- [55] EL-MELIEGY, E., VAN NOORT, R. “Design and Raw Materials of Medical Glasses”, *Glasses and Glass Ceramics for Medical Applications*, 1 ed., chapter 6, Springer New York, 2012.
- [56] ZACHARIASEN, W.H. “The atomic arrangement in glass”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 54, pp. 3841–3851, 1932.
- [57] WARREN, B.E., BISCCE, J. “The structure of silica glass by x-ray diffraction studies”, *Journal of the American Ceramic Society*, v. 21, pp. 49–54, 1938.
- [58] DIETZEL, A. “Die kationenfeldstärken und ihre beziehungen zu entglasungsvorgängen, zur verbindungsbildung und schmelzpunkten von silikaten”, *Z. Elektrochem. Angew. Phys. Chem.*, v. 48, pp. 9–23, 1942.
- [59] VOGEL, W. “Classical Theories of Glass Structure”, *Glass Chemistry*, 2 ed., chapter 4, Springer, 1994.

- [60] HILL, R.G., BRAUER, D.S. “Predicting the bioactivity of glasses using the network connectivity or split network models”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 357, pp. 3884–3887, 2011.
- [61] AGUIAR, H., SOLLA, E.L., SERRA, J. *et al.* “Raman and NMR study of bioactive Na₂O-MgO-CaO-P₂O₅-SiO₂ glasses”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 354, pp. 5004–5008, 2008.
- [62] VARSHNEYA, A.K., MAURO, J.C. “Glass formation principles”, *Fundamentals of Inorganic Glasses*, 3 ed., chapter 3, Elsevier, 2019.
- [63] KANWAL, N. “*Novel Zinc Containing Phosphate Glasses for Glass - Ionomer Cements for Bone Cement Applications*”, Ph.D. thesis, Queen Mary University of London, London, UK, 2014.
- [64] SHELBY, J.E. “Introduction to Glass Science and Technology”, *Principles of glass formation*, 2 ed., chapter 2, Royal Society of Chemistry, 2005.
- [65] UHLMANN, D.R. “Glass formation”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 25, pp. 42–85, 1977.
- [66] SCHOLZE, H. “Nature and Structure of Glass”, *Glass: nature, structure, and properties*, 1 ed., chapter 2, Springer-Verlag, 1991.
- [67] HAASEN, P. “Metallic glasses” , *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 56, pp. 191–199, 1983.
- [68] HENCH, L.L., SPLINTER, R.J., ALLEN, W.C. *et al.* “Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 5, pp. 117–141, 1971.
- [69] HUPA, L. “Melt-derived bioactive glasses”, *Bioactive Glasses: Materials, Properties and Applications*, 1 ed., chapter 1, Woodhead Publishing, 2011.
- [70] PUTZER, D., FUCHS, J., CORAÇA-HUBER, D. *et al.* “BAG-S53P4 as an additive to bone allografts: A laboratory study using an uniaxial compression test”, *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, v. 33, pp. 1875–1879, 2015.

- [71] HENCH, L.L., ANDERSSON, O. “Bioactive Glasses”, *An Introduction To Bioceramics*, 2 ed., chapter 3, Imperial College Press, 2013.
- [72] KAUR, G. “Influence of Preparation Techniques on the Properties of Bioactive Glasses”, *Bioactive Glasses: Potential Biomaterials for Future Therapy*, 1 ed., chapter 8, Springer International Publishing, 2017.
- [73] KHOSHAKHLAGH, P., RABIEE, S.M., KIAEE, G. *et al.* “Development And Characterization Of A Bioglass/chitosan Composite As An Injectable Bone Substitute”, *Carbohydrate Polymers*, v. 157, pp. 1261–1271, 2016.
- [74] SHAH, F.A. “Fluoride-containing bioactive glasses: Glass design, structure, bioactivity, cellular interactions, and recent developments”, *Materials Science and Engineering C*, v. 58, pp. 1279–1289, 2016.
- [75] FIUME, E., BARBERI, J., VERNÉ, E. *et al.* “Bioactive glasses: From parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies”, *Journal of Functional Biomaterials*, v. 9, pp. 1–33, 2018.
- [76] KAUR, G., PICKRELL, G., SRIRANGANATHAN, N. *et al.* “Review and the state of the art: Sol-gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, v. 104, pp. 1248–1275, 2016.
- [77] LI, R., CLARK, A.E., HENCH, L.L. “An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing”, v. 2, pp. 231–239, 1991.
- [78] KAUR, G. “The Potential of Glasses / Ceramics as Bioactive Materials”, *Bioactive Glasses Potential Biomaterials for Future Therapy*, v. 11, pp. 99–143, 2017.
- [79] JONES, J.R. “Sol-Gel Derived Glasses for Medicine”, *Bio-Glasses: An Introduction*, 1 ed., chapter 3, John Wiley and Sons, 2012.
- [80] ADAMS, L. A, ESSIEN, E.R., SHAIKU, R.O. *et al.* “Sol-Gel Synthesis of SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ Bioactive Glass Ceramic from Sodium Metasilicate”, *New Journal of Glass and Ceramics*, v. 3, pp. 11–15, 2013.
- [81] LOMBARDI, M., GREMILLARD, L., CHEVALIER, J. *et al.* “A Comparative

- Study between Melt-Derived and Sol-Gel Synthesized 45S5 Bioactive Glasses”, *Key Engineering Materials*, v. 541, pp. 15–30, 2013.
- [82] SHAH, F.A., BRAUER, D.S., HILL, R.G. *et al.* “Apatite formation of bioactive glasses is enhanced by low additions of fluoride but delayed in the presence of serum proteins”, *Materials Letters*, v. 153, pp. 143–147, 2015.
- [83] KAJIHARA, K. “Journal of Asian Ceramic Societies Recent advances in sol – gel synthesis of monolithic silica and silica-based glasses”, *Integrative Medicine Research*, v. 1, pp. 121–133, 2013.
- [84] OWENS, G.J., SINGH, R.K., FOROUTAN, F. *et al.* “Sol–gel based materials for biomedical applications”, *Progress in Materials Science*, v. 77, pp. 1–79, 2016.
- [85] RABIEE, S.M., NAZPARVAR, N., AZIZIAN, M. *et al.* “Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review”, *Ceramics International*, v. 41, pp. 7241–7251, 2015.
- [86] KAJIHARA, K., HIRANO, M., HOSONO, H. “Sol-gel synthesis of monolithic silica gels and glasses from phase-separating tetraethoxysilane-water binary system”, *Chemical Communications*, pp. 2580–2582, 2009.
- [87] CHASAPIS, C.T., LOUTSIDOU, A.C., SPILIOPOULOU, C. *et al.* “Zinc and human health: an update”, *Archives of Toxicology*, v. 86, pp. 521–534, 2012.
- [88] POPP, J.R., LOVE, B.J., GOLDSTEIN, A.S. “Effect of soluble zinc on differentiation of osteoprogenitor cells”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 81, pp. 766–769, 2007.
- [89] HADLEY, K.B., NEWMAN, S.M., HUNT, J.R. “Dietary zinc reduces osteoclast resorption activities and increases markers of osteoblast differentiation, matrix maturation, and mineralization in the long bones of growing rats”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 21, pp. 297–303, 2010.
- [90] HALL, S.L., DIMAI, H.P., FARLEY, J.R. “Effects of Zinc on Human Skeletal Alkaline Phosphatase Activity In Vitro”, *Calcified Tissue International*, v. 64, pp. 163–172, 1999.

- [91] VIMALRAJ, S. “Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization”, *Gene*, v. 754, pp. 1–8, 2020.
- [92] YAMAGUCHI, M., WEITZMANN, M.N. “Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- κ B activation”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 355, pp. 179–186, 2011.
- [93] YAMADA, Y., ITO, A., KOJIMA, H. *et al.* “Inhibitory effect of Zn $^{2+}$ in zinc-containing β -tricalcium phosphate on resorbing activity of mature osteoclasts”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 84A, pp. 344–352, 2008.
- [94] HUO, K., ZHANG, X., WANG, H. *et al.* “Biomaterials Osteogenic activity and antibacterial effects on titanium surfaces modified with Zn-incorporated nanotube arrays”, *Biomaterials*, v. 34, pp. 3467–3478, 2013.
- [95] JIN, G., CAO, H., QIAO, Y. *et al.* “Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc ion implanted titanium”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 117, pp. 158–165, 2014.
- [96] LEMIRE, J.A., HARRISON, J.J., TURNER, R.J. “Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications”, *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, pp. 371–384, 2013.
- [97] NANDI, S.K., MAHATO, A., KANDU, B. *et al.* “Doped Bioactive Glass Materials in Bone Regeneration”, *Advanced Techniques in Bone Regeneration*, pp. 275–328, 2016.
- [98] O’NEILL, A.E.O., AWALE, G., DANESHMANDI, L. *et al.* “The roles of ions on bone regeneration”, *Drug Discovery Today*, v. 23, pp. 879–890, 2018.
- [99] ZHANG, Y., XUN, P., WANG, R. *et al.* “Can Magnesium Enhance Exercise Performance?”, *Nutrients*, v. 9, pp. 1–10, 2017.
- [100] LAKHKAR, N.J., LEE, I.H., KIM, H.W. *et al.* “Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: Role and controlled delivery from phosphate-based glasses”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, pp. 405–420, 2013.
- [101] ZREIQAT, H., HOWLETT, C.R., ZANNETTINO, A. *et al.* “Mechanisms of

- magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 62, pp. 175–184, 2002.
- [102] CASTIGLIONI, S., CAZZANIGA, A., ALBISETTI, W. *et al.* “Magnesium and Osteoporosis: Current State of Knowledge and Future Research Directions”, *Nutrients*, v. 5, pp. 3022–3033, 2013.
- [103] SWAMINATHAN, R. “Magnesium metabolism and its disorders”, *The Clinical Biochemist. Reviews*, v. 24, pp. 47–66, 2003.
- [104] FATEMI, S., RYZEN, E., FLORES, J. *et al.* “Effect of Experimental Human Magnesium Depletion on Parathyroid Hormone Secretion and 1,25-Dihydroxyvitamin D Metabolism”, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 73, pp. 1067–1072, 1991.
- [105] PRASHANTH, L., KATTAPAGARI, K.K., CHITTURI, R.T. *et al.* “A review on role of essential trace elements in health and disease”, *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, v. 4, pp. 75–85, 2015.
- [106] LÜTHEN, F., BULNHEIM, U., MÜLLER, P.D. *et al.* “Influence of manganese ions on cellular behavior of human osteoblasts in vitro”, *Biomolecular Engineering*, v. 24, pp. 531–536, 2007.
- [107] TORRES, P.M.C., VIEIRA, S.I., CERQUEIRA, A.R. *et al.* “Effects of Mn-doping on the structure and biological properties of β -tricalcium phosphate”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 136, pp. 57–66, 2014.
- [108] SOPYAN, I., RAMESH, S., NAWAWI, N.A. *et al.* “Effects of manganese doping on properties of sol-gel derived biphasic calcium phosphate ceramics”, *Ceramics International*, v. 37, pp. 3703–3715, 2011.
- [109] DORMOND, O., PONSONNET, L., HASMIM, M. *et al.* “Manganese-induced integrin affinity maturation promotes recruitment of $\alpha V\beta 3$ integrin to focal adhesions in endothelial cells: evidence for a role of phosphatidylinositol 3-kinase and Src”, *Thrombosis and Haemostasis*, v. 92, pp. 151–161, 2004.

- [110] SURAZYNSKI, A., MILTYK, W., PALKA, J. *et al.* “Prolidase-dependent regulation of collagen biosynthesis”, *Amino Acids*, v. 35, pp. 731–738, 2008.
- [111] BAE, Y.J., KIM, M.H. “Manganese Supplementation Improves Mineral Density of the Spine and Femur and Serum Osteocalcin in Rats”, *Biological Trace Element Research*, v. 124, pp. 28–34, 2008.
- [112] FERNÁNDEZ, C.A., MARTÍNEZ, C.A., PRADO, M.O. *et al.* “Bone Regeneration with Wharton’s Jelly-Bioceramic-Bioglass Composite”, *Procedia Materials Science*, v. 9, pp. 205–212, 2015.
- [113] FIELDING, G., SUSMITA, B. “SiO₂ and ZnO Dopants in 3D Printed TCP Scaffolds Enhances Osteogenesis and Angiogenesis in vitro”, *Acta Biomaterialia*, v. 9, pp. 1–23, 2014.
- [114] HENCH, L.L. “The story of Bioglass”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 17, pp. 967–978, 2006.
- [115] CUI, N., QIAN, J., WANG, J. *et al.* “Preparation, physicochemical properties and biocompatibility of PBLG/PLGA/bioglass composite scaffolds”, *Materials Science & Engineering C*, v. 71, pp. 118–124, 2017.
- [116] PON-ON, W., CHAROENPHANDHU, N., TEERAPORNPUNTAKIT, J. “Mechanical properties , biological activity and protein controlled release by poly (vinyl alcohol) - bioglass / chitosan - collagen composite scaffolds : A bone tissue engineering applications”, *Materials Science & Engineering C*, v. 38, pp. 63–72, 2014.
- [117] LI, H., HE, J., YU, H. *et al.* “Bioglass promotes wound healing by affecting gap junction connexin 43 mediated endothelial cell behavior”, *Biomaterials*, v. 84, pp. 64–75, 2016.
- [118] BRAUER, D.S. “Bioactive Glasses-Structure and Properties”, *Angewandte Chemie International Edition*, v. 54, pp. 4160–4181, 2015.
- [119] LUSVARDI, G., MALAVASI, G., MENABUE, L. *et al.* “Properties of Zinc Releasing Surfaces for Clinical Applications”, *Journal of Biomaterials*

- Applications*, v. 22, pp. 505–526, 2008.
- [120] OKI, A., PARVEEN, B., HOSSAIN, S. *et al.* “Preparation and in vitro bioactivity of zinc containing sol-gel-derived bioglass materials”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 69A, pp. 216–221, 2004.
- [121] HAIMI, S., GORIANC, G., MOIMAS, L. *et al.* “Characterization of zinc-releasing three-dimensional bioactive glass scaffolds and their effect on human adipose stem cell proliferation and osteogenic differentiation”, *Acta Biomaterialia*, v. 5, pp. 3122–3131, 2009.
- [122] DU, R.L., CHANG, J., NI, S.Y. *et al.* “Characterization and in vitro Bioactivity of Zinc-containing Bioactive Glass and Glass-ceramics”, *Journal of Biomaterials Applications*, v. 20, pp. 341–360, 2006.
- [123] FERNANDES, H.R., GADDAM, A., REBELO, A. *et al.* “Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering”, *Materials*, v. 11, pp. 1–54, 2018.
- [124] AINA, V., MALAVASI, G., FIORIO PLA, A. *et al.* “Zinc-containing bioactive glasses: Surface reactivity and behaviour towards endothelial cells”, *Acta Biomaterialia*, v. 5, pp. 1211–1222, 2009.
- [125] AINA, V., PERARDI, A., BERGANDI, L. *et al.* “Cytotoxicity of zinc-containing bioactive glasses in contact with human osteoblasts”, *Chemico-Biological Interactions*, v. 167, pp. 207–218, 2007.
- [126] AL-NOAMAN, A., RAWLINSON, S.C.F., HILL, R.G. “The role of MgO on thermal properties, structure and bioactivity of bioactive glass coating for dental implants”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 358, pp. 3019–3027, 2012.
- [127] MA, J., CHEN, C.Z., WANG, D.G. *et al.* “Effect of MgO addition on the crystallization and in vitro bioactivity of glass ceramics in the CaO-MgO-SiO₂-P₂O₅ system”, *Ceramics International*, v. 38, pp. 6677–6684, 2012.
- [128] VALLET-REGI, M., SALINAS, A., ROMAN, J. “Effect of magnesium content on the in vitro bioactivity of CaO-MgO-SiO₂-P₂O₅ sol-gel glasses”, *Journal of*

Materials, pp. 515–518, 1999.

- [129] VARANASI, V.G., SAIZ, E., LOOMER, P.M. *et al.* “Enhanced osteocalcin expression by osteoblast-like cells (MC3T3-E1) exposed to bioactive coating glass (SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO-K₂O-Na₂O system) ions”, *Acta Biomaterialia*, v. 5, pp. 3536–3547, 2009.
- [130] CHEN, X., LIAO, X., HUANG, Z. *et al.* “Synthesis and characterization of novel multiphase bioactive glass-ceramics in the CaO-MgO-SiO₂ system”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 93, pp. 194–202, 2010.
- [131] BALAMURUGAN, A., BALOSSIER, G., MICHEL, J. *et al.* “Sol gel derived SiO₂-CaO-MgO-P₂O₅ bioglass system—Preparation and in vitro characterization”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 83, pp. 546–553, 2007.
- [132] SABOORI, A., RABIEE, M., MOZTARZADEH, F. *et al.* “Synthesis , characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO bioglass”, *Materials Science & Engineering C*, v. 29, pp. 335–340, 2009.
- [133] KNABE, C., STILLER, M., BERGER, G. *et al.* “The effect of bioactive glass ceramics on the expression of bone-related genes and proteins in vitro”, *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, pp. 119–127, 2004.
- [134] BRAUER, D.S., RÜSSEL, C., LI, W. *et al.* “Effect of degradation rates of resorbable phosphate invert glasses on in vitro osteoblast proliferation”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 77A, pp. 213–219, 2006.
- [135] PRABHU, M., KAVITHA, K., MANIVASAKAN, P. *et al.* “Synthesis, characterization and biological response of magnesium-substituted nanobioactive glass particles for biomedical applications”, *Ceramics International*, v. 39, pp. 1683–1694, 2013.
- [136] WANG, X., LI, X., ITO, A. *et al.* “Synthesis and characterization of hierarchically macroporous and mesoporous CaO-MO-SiO₂-P₂O₅ (M=Mg, Zn, Sr) bioactive glass scaffolds”, *Acta Biomaterialia*, v. 7, pp. 3638–3644, 2011.

- [137] MOYA, J.S., TOMSIA, A.P., PAZO, A. *et al.* “In vitro formation of hydroxylapatite layer in a MgO-containing glass”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 5, pp. 529–532, 1994.
- [138] BARRIONI, B.R., OLIVEIRA, A.C., LEITE, M.F. *et al.* “Sol-gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering”, *Journal of Materials Science*, v. 52, pp. 8904–8927, 2017.
- [139] BARRIONI, B.R., NORRIS, E., LI, S., NARUPHONTJIRAKUL, P. *et al.* “Osteogenic potential of sol-gel bioactive glasses containing manganese”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 30, pp. 1–15, 2019.
- [140] SRIVASTAVA, A.K., PYARE, R., SINGH, S.P. “In vitro bioactivity and physical-mechanical properties of MnO₂ substituted 45S5 bioactive glasses and glass-ceramics”, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, v. 2, pp. 249–258, 2012.
- [141] WALLACE, K.E., HILL, R.G., PEMBROKE, J.T. *et al.* “Influence of sodium oxide content on bioactive glass properties”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 10, pp. 697–701, 1999.
- [142] OGINO, M., OHUCHI, F., HENCH, L.L. “Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 14, pp. 55–64, 1980.
- [143] KITSUGI, T., NAKAMURA, T., YAMAMURA, T. *et al.* “SEM-EPMA observation of three types of apatite-containing glass-ceramics implanted in bone: The variance of a Ca-P-rich layer”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 21, pp. 1255–1271, 1987.
- [144] KOKUBO, T., OHTSUKI, C., KOTANI, S. *et al.* “Surface structure of bioactive glass-ceramic A-W implanted into sheep and human vertebra”, *Bioceramics*, v.2, pp. 113–121, 1990.
- [145] KOKUBO, T., ITO, S., HUANG, Z.T. *et al.* “Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 24, pp. 331–343, 1990.

- [146] FILGUEIRAS, M.R., LA TORRE, G., HENCH, L.L. “Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 27, pp. 445–453, 1993.
- [147] KITSUGI, T., YAMAMURO, T., NAKAMURA, T. *et al.* “The bonding of glass ceramics to bone”, *International Orthopaedics*, v. 13, pp. 199–206, 1989.
- [148] OHTSUKI, C., AOKI, Y., KOKUBO, T. *et al.* “Transmission Electron Microscopic Observation of Glass-Ceramic A-W and Apatite Layer Formed on Its Surface in a Simulated Body Fluid”, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, v. 103, pp. 449–454, 1995.
- [149] KOLAFOVÁ, M., ŠŤOVÍČEK, J., STRNAD, J. *et al.* “In Vitro Bioactivity Test of Real Dental Implants According to ISO 23317”, *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 32, pp. 1221–1230, 2017.
- [150] BOSETTI, M., CANNAS, M. “The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation”, *Biomaterials*, v. 26, pp. 3873–3879, 2005.
- [151] POPE, E.J.A., MACKENZIE, J.D. “Sol-gel processing of silica: II. The role of the catalyst”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 87, pp. 185–198, 1986.
- [152] SHARMA, K., KEDIA, S., SINGH, A.K. *et al.* “Morphology and structural studies of laser treated 45S5 bioactive glass”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 440, pp. 43–48, 2016.
- [153] “ASTM D7127-13, Standard Test Method for Measurement of Surface Roughness of Abrasive Blast Cleaned Metal Surfaces Using a Portable Stylus Instrument, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013”.
- [154] SANTOS, S.C., BARRETO, L.S., DOS SANTOS, E.A. “Nanocrystalline apatite formation on bioactive glass in a sol-gel synthesis”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 439, pp. 30–37, 2016.
- [155] SIQUEIRA, R.L., COSTA, L.C., SCHIAVON, M.A. *et al.* “Bioglass® and resulting crystalline materials synthesized via an acetic acid-assisted sol-gel route”, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 83, pp. 165–173, 2017.

- [156] CALDAS, S., SILVA, L., ARAUJO, E. “Nanocrystalline apatite formation on bioactive glass in a sol-gel synthesis”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 439, pp. 30–37, 2016.
- [157] DE BARROS COELHO, M., MAGALHÃES PEREIRA, M. “Sol-gel synthesis of bioactive glass scaffolds for tissue engineering: Effect of surfactant type and concentration”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, v. 75B, pp. 451–456, 2005.
- [158] AGATHOPOULOS, S., TULYAGANOV, D.U., VENTURA, J.M.G. *et al.* “Structural analysis and devitrification of glasses based on the CaO-MgO-SiO₂ system with B₂O₃, Na₂O, CaF₂ and P₂O₅ additives”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 352, pp. 322–328, 2006.
- [159] AHMADI, S.M., BEHNAMGHADER, A., ASEFNEJAAD, A. “sol-gel synthesis, characterization and in vitro evaluation of SiO₂-CaO-P₂O₅ bioactive glass nanoparticles with various CaO/P₂O₅ ratios”, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, v. 12, pp. 847–860, 2017.
- [160] MOHD ZAID, M.H., AMIN MATORI, K., ABDUL AZIZ, S.H. *et al.* “Fabrication and Crystallization of ZnO-SLS Glass Derived Willemite Glass-Ceramics as a Potential Material for Optics Applications”, *Journal of Spectroscopy*, v. 2016, pp. 1–7, 2016.
- [161] MEYER, U., BÜCHTER, A., WIESMANN, H.P. *et al.* “Basic Reactions of Osteoblasts on Structured Material Surfaces”, *European Cells and Materials*, v. 9, pp. 39–49, 2005.
- [162] GEISSBERGER, A.E., GALEENER, F.L. “Raman studies of vitreous SiO₂ versus fictive temperature”, *Physical Review B*, v. 28, pp. 3266–3271, 1983.
- [163] SHARMA, S.K., MAMMONE, J.F., NICOL, M.F. “Raman investigation of ring configurations in vitreous silica”, *Nature*, v. 292, pp. 140–141, 1981.
- [164] POE, B.T., ROMANO, C., HENDERSON, G. “Raman and XANES spectroscopy of permanently densified vitreous silica”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 341, pp. 162–169, 2004.

- [165] BONINO, F., DAMIN, A., AINA, V. *et al.* “In situ Raman study to monitor bioactive glasses reactivity”, *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 39, pp. 260–264, 2008.
- [166] HANDKE, M., SITARZ, M., ROKITA, M. *et al.* “Vibrational spectra of phosphate-silicate biomaterials”, *Journal of Molecular Structure*, v. 651–653, pp. 39–54, 2003.
- [167] AGATHOPOULOS, S., TULYAGANOV, D.U., VENTURA, J.M.G. *et al.* “Formation of hydroxyapatite onto glasses of the CaO-MgO-SiO₂ system with B₂O₃, Na₂O, CaF₂ and P₂O₅ additives”, *Biomaterials*, v. 27, pp. 1832–1840, 2006.
- [168] TU, Y., TERSOFF, J., GRINSTEIN, G. *et al.* “Properties of a Continuous-Random-Network Model for Amorphous Systems”, *Physical Review Letters*, v. 81, pp. 4899–4902, 1998.
- [169] HENDERSON, S. “The structure of silicate melts: a glass perspective”, *The Canadian Mineralogist*, v. 43, pp. 1921–1958, 2005.
- [170] CHENG, J., XIAO, Z., YANG, K. *et al.* “Viscosity, fragility and structure of Na₂O-CaO-Al₂O₃-SiO₂ glasses of increasing Al/Si ratio”, *Ceramics International*, v. 39, pp. 4055–4062, 2013.
- [171] SHAHRABI, S., HESARAKI, S., MOEMENI, S. *et al.* “Structural discrepancies and in vitro nanoapatite formation ability of sol-gel derived glasses doped with different bone stimulator ions”, *Ceramics International*, v. 37, pp. 2737–2746, 2011.
- [172] WATTS, S.J., HILL, R.G., O’DONNELL, M.D. *et al.* “Influence of magnesia on the structure and properties of bioactive glasses”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 356, pp. 517–524, 2010.
- [173] MOREIRA, M.P., SOARES, G.D.A., DENTZER, J. *et al.* “Synthesis of magnesium- and manganese-doped hydroxyapatite structures assisted by the simultaneous incorporation of strontium”, *Materials Science and Engineering: C*, v. 61, pp. 736–743, 2016.

- [174] SANTOS, S.C., LAZARO, G.S., DOS SANTOS, E.A. “Ordering in sol-gel-derived bioactive glasses and its influence on the dissolution/precipitation behavior in a complex culture medium”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 494, pp. 50–58, 2018.
- [175] BEJARANO, J., CAVIEDES, P., PALZA, H. “Sol-gel synthesis and in vitro bioactivity of copper and zinc-doped silicate bioactive glasses and glass-ceramics”, *Biomedical Materials*, v. 10, pp. 1–13, 2015.
- [176] DE OLIVEIRA, A.A.R., DE SOUZA, D.A., DIAS, L.L.S. *et al.* “Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications”, *Biomedical Materials (Bristol)*, v. 8, pp. 1–14, 2013.
- [177] GOEL, A., RAJAGOPAL, R.R., FERREIRA, J.M.F. “Influence of strontium on structure, sintering and biodegradation behaviour of CaO-MgO-SrO-SiO₂-P₂O₅-CaF₂ glasses”, *Acta Biomaterialia*, v. 7, pp. 4071–4080, 2011.
- [178] VEIS, A., DORVEE, J.R. “Biom mineralization Mechanisms: A New Paradigm for Crystal Nucleation in Organic Matrices”, *Calcified Tissue International*, v. 93, pp. 307–315, 2013.
- [179] GEBAUER, D., KELLERMEIER, M., GALE, J.D. *et al.* “Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallisation”, *Chemical Society Reviews*, v. 43, pp. 2348–2371, 2014.
- [180] MARGOLIS, H.C., KWAK, S.-Y., YAMAZAKI, H. “Role of mineralization inhibitors in the regulation of hard tissue biom mineralization: relevance to initial enamel formation and maturation”, *Frontiers in Physiology*, v. 5, pp. 1–11, 2014.
- [181] KANZAKI, N., ONUMA, K., TREBOUX, G. *et al.* “Inhibitory Effect of Magnesium and Zinc on Crystallization Kinetics of Hydroxyapatite (0001) Face”, *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 104, pp. 4189–4194, 2000.
- [182] DING, H., PAN, H., XU, X. *et al.* “Toward a Detailed Understanding of Magnesium Ions on Hydroxyapatite Crystallization Inhibition”, *Crystal Growth & Design*, v. 14, pp. 763–769, 2014.

- [183] BIGI, A., FORESTI, E., GANDOLFI, M. *et al.* “Inhibiting effect of zinc on hydroxylapatite crystallization”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 58, pp. 49–58, 1995.
- [184] REN, F., XIN, R., GE, X. *et al.* “Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites”, *Acta Biomaterialia*, v. 5, pp. 3141–3149, 2009.
- [185] CZEKANSKA, E.M., STODDART, M.J., RALPHS, J.R. *et al.* “A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing”, *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, v. 102, pp. 2636–2643, 2014.
- [186] SCHLAEPFER, D.D., HANKS, S.K., HUNTER, T. *et al.* “Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase”, *Nature*, v. 372, pp. 786–791, 1994.
- [187] LIU, L., WANG, J., RUSSELL, T. *et al.* “The Biological Responses to Magnesium-Based Biodegradable Medical Devices”, *Metals*, v. 7, pp. 1–14, 2017.
- [188] HUANG, B., YUAN, Y., LI, T. *et al.* “Facilitated receptor-recognition and enhanced bioactivity of bone morphogenetic protein-2 on magnesium-substituted hydroxyapatite surface”, *Scientific Reports*, v. 6, pp. 1–18, 2016.
- [189] HERNROTH, B., HOLM, I., GONDIKAS, A. *et al.* “Manganese Inhibits Viability of Prostate Cancer Cells”, *Anticancer Research*, v. 38, pp. 137–145, 2018.
- [190] RAZUMOV, I.A., ZAV’YALOV, E.L., TROITSKII, S.Y. *et al.* “Selective Cytotoxicity of Manganese Nanoparticles against Human Glioblastoma Cells”, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 163, pp. 561–565, 2017.
- [191] WESTHAUSER, F., WILKESMANN, S., NAWAZ, Q. *et al.* “Osteogenic properties of manganese-doped mesoporous bioactive glass nanoparticles”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 108, pp. 1806–1815, 2020.
- [192] GOTOH, Y., HIRAIWA, K., NAGAYAMA, M. “In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from human bone”, *Bone and Mineral*, v. 8, pp. 239–250, 1990.

- [193] WONG, M.M., RAO, L.G., LY, H. *et al.* “Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells”, *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 5, pp. 803–813, 1990.
- [194] BERESFORD, J.N., GALLAGHER, J.A., RUSSELL, R.G.G. “1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Human Bone-Derived Cells in Vitro: Effects on Alkaline Phosphatase, Type I Collagen and Proliferation”, *Endocrinology*, v. 119, pp. 1776–1785, 1986.
- [195] ZAREI, A., HULLEY, P.A., SABOKBAR, A. *et al.* “25-Hydroxy- and 1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol Have Greater Potencies than 25-Hydroxy- and 1 α ,25-Dihydroxyergocalciferol in Modulating Cultured Human and Mouse Osteoblast Activities”, *PLOS ONE*, v. 11, pp. 1–18, 2016.
- [196] KARLSSON, M., PÅLSGÅRD, E., WILSHAW, P. *et al.* “Initial in vitro interaction of osteoblasts with nano-porous alumina”, *Biomaterials*, v. 24, pp. 3039–3046, 2003.
- [197] SUN, J., WEI, L., LIU, X. *et al.* “Influences of ionic dissolution products of dicalcium silicate coating on osteoblastic proliferation, differentiation and gene expression”, *Acta Biomaterialia*, v. 5, pp. 1284–1293, 2009.
- [198] RUTKOVSKIY, A., STENSLØKKEN, K.O., VAAGE, I.J. “Osteoblast Differentiation at a Glance”, *Medical Science Monitor Basic Research*, v. 22, pp. 95–106, 2016.
- [199] STEIN, G.S., LIAN, J.B., WIJNEN, A.J. *et al.* “Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression”, *Oncogene*, v. 23, pp. 4315–4329, 2004.
- [200] BALASUBRAMANIAN, P., STROBEL, L.A., KNESER, U. *et al.* “Zinc-containing bioactive glasses for bone regeneration, dental and orthopedic applications”, *Biomedical Glasses*, v. 1, pp. 51–69, 2015.
- [201] NIKOLIC-HUGHES, I., O'BRIEN, P.J., HERSCHLAG, D. “Alkaline Phosphatase Catalysis Is Ultrasensitive to Charge Sequestered between the Active Site Zinc Ions”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, pp. 9314–9315,

2005.

- [202] NAGATA, M., LÖNNERDAL, B. “Role of zinc in cellular zinc trafficking and mineralization in a murine osteoblast-like cell line”, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 22, pp. 172–178, 2011.
- [203] LIANG, D., YANG, M., GUO, B. *et al.* “Zinc Upregulates the Expression of Osteoprotegerin in Mouse Osteoblasts MC3T3-E1 Through PKC/MAPK Pathways”, *Biological Trace Element Research*, v. 146, pp. 340–348, 2012.
- [204] SÁNCHEZ-SALCEDO, S., SHRUTI, S., SALINAS, A.J. *et al.* “In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of SiO₂-CaO-P₂O₅ meso-macroporous glass scaffolds enriched with ZnO”, *Journal of Materials Chemistry B*, v. 2, pp. 4836–4847, 2014.
- [205] ZHANG, J., ZHANG, Q., LI, S. *et al.* “The Effects of Mn²⁺ on the Proliferation, Osteogenic Differentiation and Adipogenic Differentiation of Primary Mouse Bone Marrow Stromal Cells”, *Biological Trace Element Research*, v. 151, pp. 415–423, 2013.
- [206] SANTOS, E.A. DOS, LINHARES, A.B.R., ROSSI, A.M. *et al.* “Effects of surface undulations of biphasic calcium phosphate tablets on human osteoblast behavior”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 74A, pp. 315–324, 2005.
- [207] DOS SANTOS, E.A., FARINA, M., SOARES, G.A. *et al.* “Surface energy of hydroxyapatite and β-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, pp. 2307–2316, 2008.
- [208] DOS SANTOS, E.A.A., FARINA, M., SOARES, G.A.A. *et al.* “Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and β-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 89A, pp. 510–520, 2009.
- [209] LEITE, Á.J., GONÇALVES, A.I., RODRIGUES, M.T. *et al.* “Strontium-Doped Bioactive Glass Nanoparticles in Osteogenic Commitment”, *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 10, pp. 23311–23320, 2018.

- [210] BÜHRER, G., ROTTENSTEINER, U., HOPPE, A. *et al.* “Evaluation of in vivo angiogenic effects of copper doped bioactive glass scaffolds in the AV loop model”, *Biomedical Glasses*, v. 2, pp. 111–117, 2016.
- [211] XIA, L., MA, W., ZHOU, Y. *et al.* “Stimulatory Effects of Boron Containing Bioactive Glass on Osteogenesis and Angiogenesis of Polycaprolactone: In Vitro Study”, *BioMed Research International*, v. 2019, pp. 1–12, 2019.