

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Roberto Gustavo Furlan

DESENVOLVIMENTO DE ENXERTOS ÓSSEOS BASEADOS EM
BIOVIDROS PARA IMPLANTES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientadora: Prof. Dra. Eliane Trovatti
Co-Orientador: Prof. Dr. André Capaldo Amaral

Araraquara, SP
2020



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGB-MRQM



ROBERTO GUSTAVO FURLAN

Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 12 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Eliane Trovatti

Profª Drª ELIANE TROVATTI (Orientadora)
Universidade de Araraquara - UNIARA

Mônica R de Costa Iemma

Profª Drª MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA
Universidade de Araraquara - UNIARA

Maurício Cavicchioli
Dr. MAURÍCIO CAVICCHIOLI
Instituto de Química de Araraquara/UNESP.

Leandro Fernandes
Dr. LEANDRO FERNANDES
Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Keli Regina Victorino
Drª KELI REGINA VICTORINO
Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

F984d Furlan, Roberto Gustavo

Desenvolvimento de enxertos ósseos baseados em biovidros para implantes/Roberto Gustavo Furlan. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2020.

37f.

Tese (Doutorado)- Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Profa. Dra. Eliane Trovatti

Co-Orientador: André Capaldo Amaral

1. Biovidro. 2. Sol-gel. 3. 45S5. 4. Boro.; I. Título.

CDU 577.1:66

DEDICATÓRIA

Dedico nosso trabalho à toda minha Família, em especial aos meus amados Filhos (Lorenzo e Valentina), e à minha querida Michele, que soube compreender o valor da busca pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade concedida.

Gostaria de agradecer à CAPES pelo apoio financeiro para nosso estudo.

Agradeço à UNIARA pelo acolhimento, pela estrutura oferecida, à todo corpo Docente, e funcionários em geral.

Agradeço à dedicada Secretária Sandra, sempre pronta à nos orientar nas burocracias do doutorado.

Nossa profunda Gratidão á Prof. Dra. Eliane Trovatti que a todo momento colaborou e me conduziu pelos caminhos da pesquisa.

Nossos agradecimentos ao Co-orientador Prof. Dr. André Capaldo Amaral.

Registro os mais profundos agradecimentos à querida Esposa Michele, que compreendeu a importância do estudo continuado, e me incentivou a caminhar na senda do conhecimento.

RESUMO

A demanda por enxertos odontológicos aumentou muito, assim como a necessidades de biomateriais com potencial formador ósseo. Muitos estudos têm sido dedicados à síntese do Biovidro 45S5 e seus derivados para aplicação em enxerto ósseo. Atualmente conta-se com uma grande variabilidade de formulações de biovidros, nas quais diversos elementos químicos são testados a fim de melhorar as propriedades destes biomateriais para uso em enxertia. Um destes elementos é o boro, o qual tem indicado melhoria no tempo de degradação do biovidro 45S5. A síntese convencional tanto do 45S5 quanto de seus derivados faz uso de métodos com altas temperaturas, num processo que leva os componentes à sinterização ou fusão para gerar os biovidros. Neste trabalho, foi proposto o método sol-gel para simplificar o processo de preparação do biovidro 45S5. O método de síntese foi também utilizado para uma formulação contendo boro, na tentativa de melhorar tempo de degradação deste material. As amostras foram caracterizadas por FTIR, XRD, MEV e testadas *in vitro* em condições biológicas, quanto à bioatividade e citotoxicidade em cultura de células humanas. Os resultados mostraram características semelhantes ao biovidro clássico e uma bioatividade ligeiramente menor em relação ao do biovidro 45S5, que pode representar o ponto de partida para obtenção de sistemas com taxa de degradação controláveis para uma dada aplicação clínica.

Palavras chave: biovidro, sol-gel, 45S5, boro.

Abstract

Demand for dental grafts has greatly increased, as has the need for bone-forming biomaterials. Many studies have been devoted to the synthesis of Biovidro 45S5 and its derivatives for application in bone grafting. Currently there is a great variability of bioglass formulations, in which various chemical elements are tested in order to improve the properties of these biomaterials for grafting. One of these elements is boron, which has indicated improved degradation time of the 45S5 bioglass. Conventional synthesis of both the 45S5 and its derivatives makes use of high temperature methods in a process that leads the components to sinter or melt to generate the bioglass. In this work, the sol-gel method was proposed to simplify the process of preparing the 45S5 bioglass. The synthesis method was also used for a boron containing formulation in an attempt to improve the degradation time of this material. The samples were characterized by FTIR, XRD, SEM and tested in vitro under biological conditions for bioactivity and cytotoxicity in human cell culture. The results showed characteristics similar to the classic bioglass and a slightly lower bioactivity compared to the bioglass 45S5, which may represent the starting point for obtaining controllable degradation rate systems for a given clinical application.

Keywords: bioglass, sol-gel, 45S5, boron.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Etapas da formação de hidroxiapatita na superfície do biovidro

Figura 2. Diagrama ternário

Figura 3. Esquema simplificado da reação química de formação do gel 28

Figura 4. Fotografias digitais do processo sol-gel 29

Figura 5. Variação de massa dos biovidros 45S5 e 45S5B

Figura 6. Resultados FTIR-ATR de 45S5 e 45S5B

Figura 7. Imagens de MEV de 45S5

Figura 8. Imagens MEV de 45S5B

Figura 9. Difractogramas de DRX de 45S5 e 45S5B

Figura 10. A - Viabilidade celular após tratamento com 45S5 ou 45S5B

Figura 10. B - Resultados de MTT

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os parâmetros de 2 teta (hkl) para o padrão de hidroxiapatita e os valores experimentais para 45S5 e 45S5B após 60 dias de imersão em SBF.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mA	Miliampere
45S5	Biovidro
45S5B	Biovidro sintetizado com Boro
ABS	Absorbância/Viabilidade celular
ATR	Reflexão total atenuada
BMP	Proteína óssea morfogenética
Ca ²⁺	íon cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CaO	óxido de cálcio
Cm	Centímetro
Cu K α	Radiação gerada pelo elétron α da camada K do cobre metálico
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de Raio X
FTIR	Infravermelho de Transformada Fourier
g	Gramma
h	Hora
H ₂ O	Água
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}
Na ⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₃ PO ₄	Fosfato de sódio
nm	Nanômetro
OH ⁻	Íon hidroxila
P ₂ O ₅	Pentóxido de fósforo
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	pH, índice de acidez

PTH	Paratormônio
SBF	Solução de fluido corporal simulado
SiO ₂	Dióxido de silício
Si-OH	Silanol
SOL-GEL	Estado físico do material
TEOS	Tetraetilortosilicato
μL	Microlitro
v	Volume
I _c	Concentração inibitória

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
θ	Teta
kV	Quilovolts

SUMÁRIO

1. Introdução e contextualização	1
2. Revisão de literatura	2
2.1 Tecido ósseo	3
2.2 Enxertos odontológicos	7
2.3 Biovidros	10
2.4 Processo sol-gel	13
3. Materiais e métodos	14
3.1 Materiais	14
3.2 Composição e preparação da amostra	15
3.3 Caracterização	15
3.3.1 Bioatividade <i>in vitro</i>	15
3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura	16
3.3.3 FTIR	16
3.3.4 DRX	16
3.3.5 Testes de citotoxicidade	17
3.3.5.1 Extrato de amostra	17
3.3.5.2 Cultura de células	17
3.3.5.3 Teste de citotoxicidade	17
4. Resultados e Discussão	18
4.1 Preparo do biovidro	18
4.2 Bioatividade <i>IN VITRO</i>	20
4.3 FTIR	22
4.4 MEV	25
4.5 DRX	28
4.6 Estudos de citotoxicidade	29
5. Conclusões	32
6. Bibliografia	33

1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

O advento da implantodontia revolucionou a Odontologia moderna. A possibilidade da reposição do elemento dental extraído, fez da implantodontia uma especialidade que reinventou os planejamentos e reabilitações protéticas. As antigas próteses fixas, removíveis e endodontias malsucedidas, agora são prontamente solucionadas com a possibilidade da instalação de implantes. O aumento da expectativa de vida contribui para o aumento da demanda, uma vez que os pacientes, na grande maioria das vezes, necessitam de enxertos ósseos prévios à instalação de próteses implanto-suportada. Nestes pacientes que sofreram perda óssea, o enxerto bem-sucedido possibilita o aumento do volume ósseo, necessário à instalação do implante.

A instalação do implante deve ser realizada em leito ósseo com disponibilidade de quantidade e qualidade ósseas mínimas necessárias. O implante deve ser devidamente instalado em suporte ósseo adequado, para receber as forças mastigatórias que recaem sobre ele. Os sistemas de roscas externas e conexões internas sofreram mudanças ao longo dos anos, aumentando a longevidade e otimizando a fixação das próteses. Hoje as reabilitações implanto-suportadas são seguras e previsíveis para utilização na odontologia. Porém, ainda há desafios importantes relativos às propriedades dos biomateriais para enxerto ósseo a serem superados, o que faz com que a demanda por biomateriais para aplicação em enxertia óssea odontológica seja crescente.

Dentre os principais biomateriais utilizados clinicamente para enxertia óssea cita-se os enxertos xenógenos, de origem bovina e os homólogos, ambos com excelência em muitas qualidades, porém, cujo grande desafio é a baixa taxa de degradação. Dentre os biomateriais sintéticos para esta aplicação, estes resumem-se basicamente a hidroxiapatitas e biovidros, ambos menos utilizados que os enxertos citados acima devido à baixa resistência mecânica. A grande vantagem dos materiais sintéticos é justamente a possibilidade de suas sínteses em laboratório, para a qual há matéria prima disponível e abundante, livre de quaisquer contaminantes de origem biológica que poderiam causar doenças ou disparar processos de rejeição. Porém, ainda existe muito a ser desenvolvido neste campo para que estes biomateriais alcancem propriedades adequadas.

De forma geral, as propriedades intrínsecas de um material como um todo dependem de sua composição e organização, ou interações relativas à estrutura do material, conferidas tanto pela composição, quanto pelo processamento. Diante da demanda por novos biomateriais para aplicação na área de enxertia odontológica, este trabalho tem como finalidade o estudo das propriedades do biovidro 45S5 e de seu derivado contendo o elemento químico boro, quanto à bioatividade em ambiente fisiológico (*in vitro*), após síntese por uma metodologia não convencional, o método sol-gel para verificar se o método de síntese interfere nas propriedades do biomaterial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O aumento da longevidade populacional fez com que aumentasse muito a demanda por próteses sobre implantes. Os recursos médicos, informações e melhorias no sistema de saúde, faz com que cada vez mais pessoas procurem o recurso do implante para reposição dental. Parte dos pacientes que necessitam de instalação de implantes não possuem leito ósseo adequado para realização da cirurgia. Esta população mais velha passou por um período da Odontologia onde a extração dentária era realizada mais rotineiramente. Até mesmo casos que poderiam ser resolvidos com endodontia ou algum procedimento mais complexo à época, eram tratados com extração do elemento dental. Como resultado, muitos destes pacientes chegaram aos dias de hoje com ausência de vários elementos dentais (HABRAKEN, W. et al., 2016). A perda do elemento dental desencadeia um processo fisiológico de reabsorção óssea, reduzindo progressivamente o osso alveolar ao longo dos anos. Sabe-se que a extração de dentes resulta em alterações dimensionais significativas no osso alveolar, extensivamente estudados, tanto em modelos animais (ARAÚJO, M. G. et al., 2005; ARAÚJO, M. G. et al., 2005), quanto em humanos, em numerosos estudos (DEVLIN, H. et al., 2002; GHOLAMI, A. G. et al., 2011; TROMBELLI, L. et al., 2008). A ausência do elemento dentário que pode ser resultado de doenças mutiladoras, infecções, traumatismos, acidentes, entre outros, acaba por levar a uma redução global da altura e largura da crista óssea, sendo este

um dos principais fatores de perda das dimensões ósseas, fato que impede a reposição do dente através do implante (HABRAKEN, W. et al., 2016).

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o tecido mais resistente e rígido do corpo humano, apresentando funções como estrutura para movimentação do corpo, suporte para órgãos vitais, aloja a medula óssea, proporciona apoio para músculos esqueléticos, absorve impacto e atua como reservatório de diversos minerais do corpo, principalmente cálcio, fosfato e outros íons. Além de ser capaz de absorver toxinas e metais pesados, minimizando seus efeitos adversos. (ALTAIR, D. A. et al., 2007).

A fração orgânica da matriz óssea é formada por fibras colágenas representando 35% da massa que compõe o osso e é responsável pela capacidade plástica do mesmo. A fração inorgânica ou não proteica representa cerca de 65% da massa da matriz óssea, sendo composta principalmente por íons de fosfato e cálcio, formando a hidroxiapatita (ALTAIR, D. A. et al., 2007).

As superfícies externas e internas dos ossos são recobertas por tecido conjuntivo, com a presença de células osteogênicas (precursoras de células ósseas), constituindo respectivamente, o perióstio e o endóstio (JUNQUEIRA, et al., 2008).

O perióstio reveste a superfície externa dos ossos, é uma membrana de tecido conjuntivo que possui duas camadas, a mais superficial é densa, muito fibrosa e que confere certa resistência aos impactos, contém fibras de Sharpey, que são feixes de fibras colágenas que penetram no tecido ósseo e prendem o perióstio ao osso. A camada mais interna é celular e vascularizada, contendo células osteoprogenitoras, que se diferenciam em osteoblastos, com importante papel no crescimento dos ossos durante a reparação de fraturas (JUNQUEIRA, et al., 2008).

O endóstio é formado por células osteogênicas que revestem as cavidades dos ossos esponjosos, o canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann. As funções destas camadas de revestimento são a nutrição do tecido ósseo e

fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e recuperação do osso (JUNQUEIRA, et al., 2008).

O tecido ósseo pode ser classificado em primário ou imaturo pelo fato de ser o primeiro tecido ósseo a se formar no desenvolvimento fetal e durante a reparação óssea. É um tipo de tecido não lamelar, sendo gradativamente substituído por tecido lamelar ou secundário. É pouco frequente no adulto, sendo observado somente próximo às suturas cranianas, nos alvéolos dentários e em pontos de inserção de tendões. O tecido primário é rico em osteócitos, com feixes de fibras colágenas dispostas aleatoriamente e com menores quantidades de minerais (JUNQUEIRA, et al., 2008).

Tecido ósseo secundário (lamelar) ou maduro é uma variedade mais encontrada nos adultos, possui fibras colágenas organizadas em lamelas paralelas umas às outras ou em camadas concêntricas em torno de canais com vasos e nervos, formando os Sistemas de Havers ou ósteons. Os osteócitos estão dispostos em lacunas em intervalos regulares entre lamelas ou, ocasionalmente, dentro das lamelas. A matriz do tecido ósseo secundário é mais calcificada, porém os osteócitos fazem comunicações entre si através de prolongamentos citoplasmáticos dentro de canaliculos que saem das lacunas e, assim, há maior facilidade de fluxo de nutrientes, íons, hormônios e produtos do metabolismo entre estas células. O tecido ósseo compacto possui quatro tipos de sistemas de lamelas: ósteons, lamelas circunferências externas, lamelas circunferências internas e lamelas intersticiais. Os ósteons são cilindros de lamelas dispostas concentricamente ao redor de um espaço, contendo vasos e nervos, denominado canal de Havers. Dentro de cada lamela, os feixes colágenos são paralelos, quase perpendiculares aos feixes das lamelas adjacentes e, separando grupos de lamelas, ocorre frequentemente o acúmulo de uma substância cimentante, composta de matriz mineralizada com pouco colágeno.

Os canais de Havers ao centro das lamelas comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso através dos canais de Volkmann, que atravessam as lamelas ósseas. As lamelas circunferências externas e internas são constituídas por lamelas ósseas paralelas entre si, formando duas faixas: uma mais interna, em volta do canal medular e próxima ao endóstio e outra mais externa, próxima ao perióstio. Entre os dois sistemas

de lamelas circunferências existem vários restos de sistemas de Havers, que foram destruídos durante o crescimento do osso, formando grupos irregulares de lamelas, com forma triangular, chamadas lamelas intersticiais.

Aproximadamente 99% do cálcio corporal encontra-se no esqueleto, principalmente sob a forma de cristais de hidroxiapatita. O restante (1%) encontra-se nos dentes, tecidos moles e no fluido extracelular. Cerca de 1% do cálcio ósseo é livremente intercambiável com o cálcio do fluido extracelular. (ALTAIR, D. A. et al., 2007).

Para a homeostase do cálcio, três hormônios estão envolvidos com grande importância no controle do seu metabolismo: a vitamina D ativa, o paratormônio (PTH) e a calcitonina 1. A manutenção de concentrações adequadas de Ca no sangue é prioritária sobre a manutenção da integridade estrutural do osso (MACARI, M. et al., 2002).

O tecido ósseo é um tecido vivo, continuamente renovado e reconstruído em constante metabolismo, composto basicamente por osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (JUNQUEIRA, et al., 2008).

O osteoblastos são células diferenciadas que produzem a matriz óssea, secretando colágeno e a substância fundamental, que constituem o osteóide (matriz óssea recém formada) e situam-se em aposição ao osso em formação. Essas células também participam da calcificação da matriz, através da secreção de pequenas vesículas ricas em fosfatase alcalina para o interior desta, durante o período em que a célula está produzindo a matriz óssea (JUNQUEIRA, et al., 2008).

Os osteoclastos são células responsáveis pela reabsorção óssea. São células grandes, que surgem pela fusão de células mononucleadas e podem ter até 50 núcleos. Originam-se de monócitos hematopoiéticos e macrófagos. Quando fazem uma depressão na matriz pela reabsorção de tecido ósseo, forma as lacunas de Howship. A superfície ativa do osteoclasto apresenta uma região chamada de zona clara, formada por um citoplasma pobre em organelas e rico em actina e com muitos prolongamentos vilosos voltados para a matriz óssea, formando um microambiente fechado, onde é realizada a reabsorção óssea. O osteoclasto libera ácido, colagenase e outras hidrolases, que digerem a matriz orgânica e dissolvem os cristais de sais de cálcio (JUNQUEIRA, et al., 2008).

A parte do osteoclasto que entra em contato com o osso se apresenta altamente pregueada e é chamada de borda estriada. Esta varre a superfície do osso, continuamente alterando sua configuração, à medida que libera ácidos e enzimas hidrolíticas que dissolvem a matriz protéica e os cristais de minerais. Quando a reabsorção é completada, os osteoclastos são inativados e perdem alguns de seus núcleos. A inativação compreende a fissuração da célula polinucleada gigante, de volta a células mononucleadas (JUNQUEIRA, et al., 2008).

Os osteócitos são osteoblastos que ficaram aprisionados na matriz óssea em formação, possuindo reduzida atividade sintética e secretora. Os osteócitos apresentam forma estrelada com prolongamentos citoplasmáticos que através de canaliculos se comunicam com outros osteócitos formando uma rede de comunicação entre eles. Os osteócitos são responsáveis pela manutenção do tecido ósseo vivo, além de fazerem o transporte de cálcio e outros íons (KUMAR et al., 2010).

A remodelação óssea inicia-se com o desenvolvimento de atividade osteoclástica adjacente aos vasos sanguíneos presentes nos canais harvesianos. O caminho percorrido pelos osteoclastos através do osso maduro forma um verdadeiro cone de corte, que se torna ocupado por tecido vascular e células osteogênicas. Os osteoclastos liberam na matriz óssea, fatores osteoindutivos aos pré-osteoblastos, provocando sua diferenciação e estimulando por sua vez, a formação de osso lamelar no interior do cone de corte (MEKLE, M. C. et al., 1995).

As células pré-osteoblásticas são derivadas de células mesenquimais indiferenciadas, presentes em todas as superfícies não reabsorvidas (periósteo e endósteo). Caracterizam-se por possuir muitos ribossomos livres e pouca quantidade de reticulo endoplasmático rugoso e pequenos complexos de Golgi. Possuem a função de se diferenciar em osteoblastos, promovendo a deposição da matriz ativa e podem, por fim, se diferenciar em dois tipos de células: células ósseas de recobrimento e osteócitos. As células ósseas de recobrimento são células alongadas que recobrem a superfície do tecido ósseo e não apresentam atividade de síntese (JUNQUEIRA, et al., 2008).

Como a osteogênese está sempre estritamente relacionada ao crescimento de tecido vascular, as células perivasculares, em forma de estrela (pericito), são

consideradas as principais células osseoprogenitoras. A diferenciação e o desenvolvimento dos osteoblastos pelas células osseoprogenitoras são dependentes da liberação das proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) e fatores de crescimento (RATNER, 2004).

De forma geral, os enxertos ósseos podem ser vistos como materiais complexos porque o tecido ósseo é uma estrutura muito especializada e complexa. O tecido ósseo está longe de ser uma simples estrutura dura e acelular, ao contrário do que pensamos é um órgão muito celularizado e metabolicamente ativo (JUNQUEIRA, et al., 2008).

2.2 ENXERTOS ODONTOLÓGICOS

As tecnologias e materiais para aumento ósseo têm beneficiado pacientes e representam uma rotina clínica na atualidade, com uma grande variedade de biomateriais comercialmente disponíveis. Os materiais de enxertia óssea para implantes dentários podem beneficiar um grande número de pessoas e representam uma grande parte dos biomateriais no mercado. (RODELLA, L. F. et al., 2011). Uma solução frente às diversas causas de perdas ósseas são as enxertias odontológicas, procedimentos capazes de proporcionar aumento das dimensões ósseas no leito receptor para possibilitar a instalação dos implantes e consequente reabilitação protética (HANNINK, G. et al., 2011; FARR, J. N. et al., 2015).

Os implantes dentários são dispositivos, usinados em titânio, com roscas em sua superfície externa para travamento junto ao tecido ósseo e sistema de conexão em sua parte interna para instalação da prótese. As indústrias de implantes melhoraram muito a superfície dos implantes, favorecendo o contato osso-implante, para obtenção da osseointegração (DEVLIN, H. et al., 2002).

Os procedimentos cirúrgicos para enxertia odontológica visam o ganho de osso em altura ou largura de determinada região bucal, através da inserção de enxertos ósseos. A enxertia óssea odontológica é realizada, em sua grande maioria, em consultórios dentários, e alguns casos são necessariamente realizados em ambientes hospitalares. São técnicas cirúrgicas seguras e

previsíveis, tanto para o paciente como para o profissional. (KOKUBO, T. et al., 2003).

Os enxertos ósseos odontológicos podem ser classificados quanto à sua origem em autógeno, homogêneo, xenógeno e aloplásticos (DANTAS, T. S. et al., 2011; JONES, A. C. et al., 2009). Os enxertos ósseos odontológicos autógenos ou autólogos são enxertos ósseos onde os fragmentos ósseos são retirados do próprio paciente. Os enxertos ósseos homogêneos ou homólogos são enxertos provenientes de doadores da mesma espécie animal, como por exemplo, doadores cadáveres cujos ossos são usados para enxertia em seres humanos. Os enxertos ósseos xenógenos ou xenólogos são enxertos derivados de outra espécie animal, como por exemplo, o uso de osso de origem suína ou bovina em ser humano. E por fim os enxertos ósseos aloplásticos ou sintéticos, que são enxertos ósseos obtidos em laboratório a partir do processamento de matérias primas, as quais são transformadas nos biomateriais de interesse, portanto, daí o nome “sintético”. Os exemplos mais comuns são as hidroxiapatitas e biovidros (ABBAS, et al., 2015).

Quanto à qualidade dos enxertos, os enxertos autógenos são considerados como padrão ouro por apresentarem as melhores características para uso na implantodontia. Não causam rejeição e apresentam todas as características muito semelhantes, pois são originários do próprio hospedeiro. Porém seu uso tem sido bastante restrito uma vez que requer uma segunda cirurgia para retirada de enxerto autógeno, aumentando a morbidade do paciente, risco de infecção e tempo cirúrgico, além da necessidade de área doadora e de volume de material para ser retirado, sem causar prejuízo ao sítio doador (JONES, A. C. et al., 2009).

Quanto à apresentação, os enxertos podem ser disponibilizados em forma de grânulos, pó, blocos ou pastas (JONES, A. C. et al., 2009).

Estes enxertos podem ser ainda classificados quanto a sua atividade metabólica em osteocondutor, osteoindutor e osteogênico. Os materiais osteocondutores são caracterizados pela capacidade de fornecer um arcabouço para o crescimento ósseo. Os materiais osteoindutores possuem a capacidade de induzir células pré-osteoblásticas a se diferenciarem em osteoblastos e iniciarem a formação óssea. Os materiais osteogênicos possuem células viáveis, capazes de formar tecido ósseo como no caso de enxerto autógeno (DANTAS, T. S. et al., 2011). O tamanho, forma e porosidade destes biomateriais tem uma

grande influência na formação do novo osso (EGGLI, O. S. et al.,1987; HABIBOVIC, P. et al.,2008). Nos biomateriais em forma de grânulos ou em blocos (scaffold), a formação do arcabouço e a presença de poros interconectados favorecem a infiltração e angiogênese neste biomaterial, levando células e nutrição para a formação do novo osso e preenchimento local por este tecido de substituição (HABIBOVIC, P. et al.,2007; WENZ, B. et al., 2011). Em algumas enxertias odontológicas, dependendo do local indicado, o biomaterial utilizado sofrerá pressão dos tecidos circundantes locais, assim como o processo de reabsorção deste material para formação local de tecido conjuntivo fibroso. A resistência e a permanência do biomaterial no local por determinado período de tempo favorece a substituição deste para formação do novo osso.

O tempo de degradação em concomitância com a formação óssea favorece a manutenção de um ambiente propício à boa qualidade do novo osso no local da enxertia. Assim, se o enxerto degrada-se ao mesmo tempo que o novo osso é formado, ele é capaz de manter o arcabouço necessário à formação óssea e, por ocupar espaço, impede a invasão de tecidos fibrosos, favorecendo a formação óssea, que não ocorreria se o espaço fosse tomado por tecidos moles (RATNER, 2004).

A biodegradação muito precoce de um biomaterial, leva à sua reabsorção muito antes do tempo necessário para a organização das estruturas locais para a formação óssea, inviabilizando a formação do osso no local, portanto, a rápida biodegradabilidade do material não é desejada. Da mesma forma, a degradação muito lenta em função do tempo retarda a reabsorção do biomaterial local, impedindo ou retardando a formação óssea desejada. Desta forma, o tempo de degradação é de grande importância na qualidade do osso formado. Por este motivo, o cenário ideal seria a formação óssea e a biodegradação do enxerto ocorrerem de forma sincronizada no que se refere ao fator tempo (HANNINK, G. et al., 2011). A velocidade de biodegradação e o tipo de célula envolvida no processo de reabsorção são determinados por propriedades do material como a relação cálcio / fósforo, cristalinidade, tamanho de partícula, área superficial, porosidade e o ambiente biológico local, como pH, presença de células e teor de H₂O (HANNINK, G. et al., 2011).

Outra característica de relevância do biomaterial é a sua resistência mecânica, pois esta confere a característica de manter o arcabouço e resistir às pressões dos tecidos circundantes, mantendo e protegendo o espaço da invasão por tecidos fibrosos (HANNINK, G. et al., 2011).

Dentre os materiais mais utilizados para enxertia óssea destaca-se o osso bovino desmineralizado. Este é amplamente utilizado em aplicações clínicas, no entanto, sua origem heteróloga pode representar um problema em um futuro próximo (RODELLA, L. F. et al., 2011; ZIJDERVELD, A. S. et al., 2005)], uma vez que os derivados de animais tendem a ser evitados para implantes humanos. As hidroxiapatitas sintéticas não apresentam desempenho adequado quando comparadas ao osso bovino e a problemática refere-se ao baixo desempenho em aplicações de sustentação e baixa biodegradabilidade, em geral devido ao alto grau de cristalinidade (ŠUPOVÁ, M., 2015). Dessa forma, a carência em relação aos biomateriais sintéticos para aumento ósseo que se comportam adequadamente dentro do corpo humano estimula novos estudos e o desenvolvimento de materiais alternativos. Um biomaterial com propriedades promissoras, porém ainda não ideais são os biovidros.

2.3 Biovidros

Atualmente, a regeneração óssea representa um grande desafio para odontologia, pois diversos biomateriais estão sendo testados em diferentes estudos clínicos, *in vitro* e *in vivo*. O biovidro é um material biocompatível, não tóxico que estimula a neoformação óssea, apresenta eficácia na redução do tempo da regeneração óssea, além de ter fácil adaptação no defeito ósseo (Pires et al., 2015).

O uso dos biovidros teve início com o desenvolvimento inovador do Bioglass (Pires et al., 2015), ou o biovidro 45S5, sintetizado por Larry Hench em 1970 (HENCH, L. L., 2006). O biovidro 45S5 é um vidro bioativo à base de sílica, biocompatível que em condições fisiológicas, devido a sua composição química é capaz de formar em sua superfície uma camada de hidroxiapatita carbonatada. Em uma definição mais ampla “*Bioglass*” é o nome dado a uma série de composições de vidros baseados no sistema SiO_2 , Na_2O , CaO , P_2O_5 . A

composição do Bioglass 45S5 é de 24,5% de Na_2O , 24,4% de CaO , 6% de P_2O_5 e 45% de SiO_2 . A camada de hidroxiapatita carbonatada promove uma boa interação interfacial com o tecido ósseo, levando a uma boa osteointegração (Oréfice et al., 2006) conforme esquema representado no Figura 1.

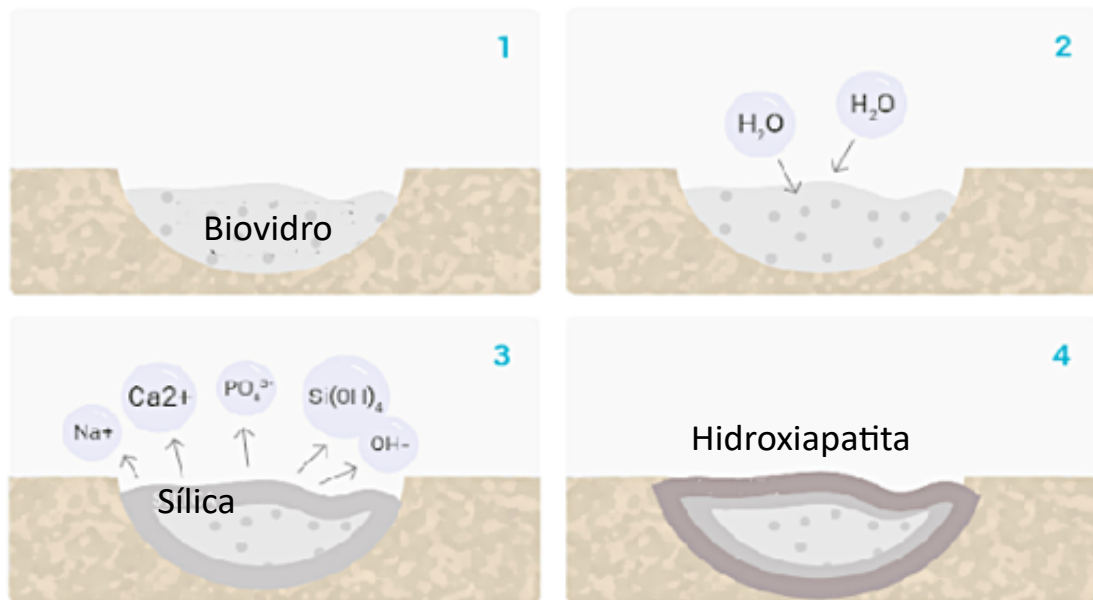


Figura 1- Etapas da formação de hidroxiapatita na superfície do biovidro: 1- enxerto do biovidro no defeito ósseo, 2- migração da água para o interior do biomaterial, 3- troca de íons com o meio ambiente, 4- formação (precipitação) de hidroxiapatita na superfície do biovidro (modificado de <http://noraker.com/bioactive-glass/>).

Os estudos realizados por Hench indicaram que a composição do biovidro tem influência direta na formação de hidroxiapatita e foram registrados em um diagrama ternário conforme representado na Figura 2, para auxiliar nas formulações. Na região A localizam-se composições que formam ligações com os ossos. Na região B, composições com maior resistência mecânica. Na região C, encontram-se composições com alta degradabilidade. Já na região D, estão as composições que não apresentam ligações com os tecidos, portanto não foram estudados como implantes (HENCH, L. L., 2006).

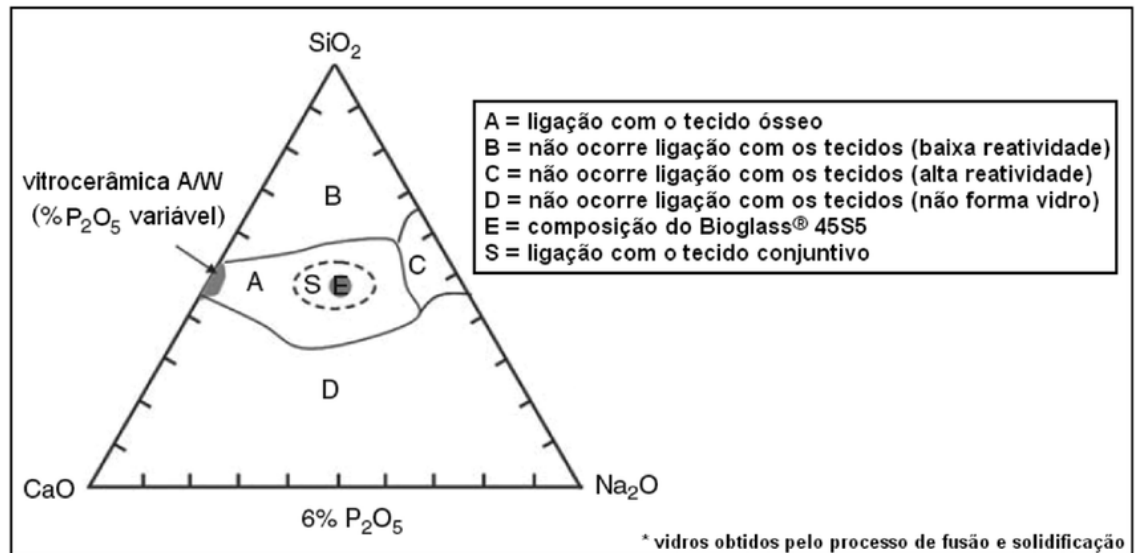


Figura 2. Diagrama ternário SiO₂-CaO-Na₂O mostrando a relação existente entre composição e índice de bioatividade (adaptado de SIQUEIRA e ZANOTTO, 2011).

O biovidro descrito como 45S5 Bioglass® foi a composição mais estudada para aplicações médicas, porque sua composição contendo baixo teor de SiO₂ (comparando a outros biovidros a base de sílica), e elevado teor de Na₂O e de CaO, é responsável pela bioatividade deste biovidro (HENCH, L. L. et al., 1971). Porém, apesar de sua boa bioatividade e interação óssea, suas propriedades mecânicas e taxa de degradação, ainda representam obstáculos ao aumento de suas aplicações clínicas.

Por este motivo, a formulação 45S5 tem sido constantemente modificada com o objetivo de melhorar as propriedades de seus derivados (HENCH, L. L. et al., 1971). Dentre os diversos elementos químicos que podem ser utilizados para alterar as propriedades de biovidros, o boro representa um elemento interessante, mas poucas informações podem ser encontradas na literatura com relação ao seu uso em formulações à base de silicatos. O boro melhora a qualidade dos vidros, especialmente os vidros fosfatos, é suscetível à hidrólise pela formação de ligações B-OH na água, que catalisa a bioatividade de seus derivados (SHANKHWAR, N. et al., 2016; SOUBELET, C. G. et al., 2018), melhorando a qualidade dos vidros para usos biológicos (KOKUBO, T. et al., 2003; LUCACEL, C. R. et al., 2014; PAZARÇEVIREN, A. E. et al., 2018;

VASSILAKOPOULOU, A. et al., 2016). Os vidros de borato livres de sílica (vidros de borossilicato) representam bom substrato para adesão, proliferação e diferenciação celular (FU, Q. et al., 2010). *in vivo* (BI, L. et al., 2013) e são capazes de induzir a angiogênese (LIN, Y. et al., 2014), e a neovascularização (FU, Q. et al., 2010). Além destes exemplos, o biovidro 45S5 contendo boro a 2% em massa, aumenta a angiogênese em testes *in vitro* utilizando membrana corioalantóide de codorna embrionária (FU, Q. et al., 2010). Poucos relatos podem ser encontrados na literatura para a preparação de vidros bioativos a base de sílica associados ao boro (DELIORMANLI, A. M., 2013; LUCACEL, C. R. et al., 2014; SHAH, F. A. et al., 2018). Assim, novas investigações são necessárias para aumentar a gama de vidros bioativos à base de boro-silicato e também as tecnologias para o seu desenvolvimento, visando melhorar o processamento e a qualidade desses materiais para estimular a taxa de aumento ósseo na região oral.

2.4 Processo sol-gel

O processo sol-gel representa uma alternativa para a preparação de biovidro em que a estrutura (incluindo a cristalinidade) e a morfologia podem ser controladas quando comparadas ao processo de têmpera por fusão, devido à baixa temperatura de tratamento térmico. Em geral, o processo sol-gel gera materiais com alta homogeneidade e pureza, é rápido e permite a utilização de componentes diferentes daqueles utilizados nas preparações efetuadas somente pelo tratamento térmico. (LI, R. et al., 1991; LUCACEL, C. R. et al., 2014). O tratamento térmico a baixas temperaturas (~700 °C), quando comparado ao processo de fusão, reduz os custos da síntese, mas o mais importante é a possibilidade de gerar materiais com propriedades diferenciadas devido à morfologia do material.

O sol-gel é um processo caracterizado pela transição de um sol em um gel. O sol pode ser definido como uma suspensão coloidal de partículas sólidas em um líquido e o gel pode ser definido como uma rede sólida ocupada por um solvente em seu interior, formando uma rede tridimensional. O sol é composto por componentes que sofrem reações químicas para formar os

macrocomponentes constituintes do gel. Desta forma, o processo sol-gel pode ser entendido como aquele caracterizado pela transformação de um material inicialmente no estado sol em um gel (PIERE, 1998). A remoção do solvente leva à formação de um material sólido, no estado particulado, ou em blocos, de acordo com o processo de secagem.

Encorajados pelo uso do processo sol-gel para melhorar as propriedades dos vidros a base de 45S5, aqui relatamos a preparação e caracterização de um vidro de silicato bioativo a base de boro, através do processo sol-gel para estudo de sua bioatividade, visando entender as propriedades deste biomaterial quando comparada ao biovidro 45S5 sintetizado da mesma maneira. A estrutura dos biovidros foi caracterizada por FTIR e DRX, e a morfologia foi observada por MEV. A bioatividade e a biodegradação em condições fisiológicas *in vitro* foram estudadas, bem como sua citotoxicidade *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Sais cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio ($\text{NaPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), ácido bórico (H_3BO_3) cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3), hidrogênio dipotássico fosfato tri-hidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), etanol, ácido clorídrico (HCl), hidróxido de amônio (NH_4OH), dimetilsulfóxido, adquiridos da Synth (Brasil), tetraetilortossilicato (TEOS), sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e tris (hidroximetil) aminometano ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), brometo de 3- (4,5 dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) adquiridos da Sigma Aldrich USA. Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e soro bovino fetal foram adquiridos da Cultilab (Brasil), o sal de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi adquirido da Merck (EUA), álcool isopropílico e solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram adquiridos da Synth (Brasil) e a tripsina foi fornecida pela Gibco (EUA). Todos os solventes e reagentes (grau analítico) foram usados como comprados. As células Osteo1 (células de calvária de rato) foram fornecidas pela Prof. Selistre de Araújo, laboratório LBBM, UFscar, São Carlos, Brasil.

3.2 COMPOSIÇÃO E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Os vidros bioativos foram preparados pelo método sol-gel. Para o preparo do biovidro 45S5, dissolveu-se o NaCl (3,9 g) em 5 mL de água deionizada e adicionou-se a uma solução TEOS: etanol (16,8 mL: 16,5 mL) sob agitação magnética à temperatura ambiente, seguido por adição da solução de HCl (0,6 M, 900 μ L). O balão foi agitado durante 15 min após hidrólise de TEOS. Dissolveu-se o $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{NaPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (1,6 g) em 7,5 mL de água deionizada e adicionou-se à solução de TEOS. O pH foi ajustado para 5 (\pm 0,5) com NH_4OH (3 mL) e colocado em repouso para condensação (cerca de 30 min). O gel foi mantido selado durante uma semana e depois seco à temperatura ambiente. O tratamento térmico foi realizado utilizando-se forno automatizado (EDG 3000-10 P, Tecnal, Brasil), sendo a temperatura aumentada a 10 $^\circ\text{C}$ / min e mantida a 700 $^\circ\text{C}$ por 3 horas. O pó seco foi moído usando um almofariz. Procedimento semelhante foi usado para a preparação do biovidro 45S5B, porém o volume de água foi aumentado devido à baixa solubilidade do ácido bórico (0,2 g), que foi dissolvido em 10 mL de água deionizada e então, adicionado à suspensão antes da adição de NH_4OH .

3.3 CARACTERIZAÇÃO

3.3.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO BIOVIDRO EM SBF (FORMAÇÃO DE HIDROXIAPATITA - BIOATIVIDADE *IN VITRO*)

A avaliação da bioatividade *in vitro* dos materiais foi realizada pela imersão de 100 mg de cada amostra em 25 mL de soluções de fluido corporal simulado (SBF) por 60 dias a 37 $^\circ\text{C}$. A solução de SBF foi preparada de acordo com a fórmula descrita por Kokubo (KOKUBO et al., 2003). Brevemente, os sais NaCl (8 g), NaHCO_3 (0,35 g), KCl (0,22 g), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \sim 3\text{H}_2\text{O}$ (0,23 g), $\text{MgCl}_2 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g), CaCl_2 (0,28 g) e Na_2SO_4 (0,07 g), tris (hidroximetil) aminometano (6,04 g) foram dissolvidos em água deionizada a 37 $^\circ\text{C}$ e ácido clorídrico 1 M foi

adicionado até atingir pH 7,4. As amostras foram retiradas em intervalos de 0,3, 1, 2, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Duas amostras foram usadas para cada tempo de imersão. Após a remoção da solução de SBF, as amostras foram centrifugadas com água deionizada e secas a 60 °C até o peso constante. Para avaliação da bioatividade, a formação do fosfato de hidróxido de cálcio carbonatado na superfície das amostras foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Infravermelho de Transformada Fourier (FTIR) e Difração de Raio X (DRX).

3.3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens MEV foram avaliadas usando um microscópio FEG 50 Philips e as amostras foram recobertas com carbono evaporado.

3.3.3 FTIR

A transmitância do FTIR foi registrada a temperatura ambiente, com número onda variando de 4000 a 600 cm^{-1} e a média de 16 varreduras usando um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum 100 equipado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR) para análise estrutural.

3.3.4 DRX

A difração de raios X (DRX; PANalytical EMPYREAN, Holanda) foi utilizada para estudar a cristalinidade e a composição de fases das amostras. Padrões de DRX foram registrados em um tamanho de passo de $0,026^\circ$ na faixa de 2 a 10 de 10 a 80° usando uma radiação Cu $K\alpha$ a uma voltagem de operação e corrente de 40 kV e 40 mA, respectivamente.

3.3.5. TESTES DE CITOTOXIDADE

3.3.5.1 EXTRATO DA AMOSTRA

Duzentos miligramas de 45S5 ou 45S5B foram extraídos em 1 mL de DMEM por 24h, em temperatura ambiente, seguindo a norma ISO 10993-5. O extrato líquido para os testes de citotoxicidade foi preparado usando 200 mg.mL⁻¹ de 45S5 ou 45S5B em meio de cultura DMEM à temperatura ambiente, por 24h. O extrato foi separado do biovidro por centrifugação a 1 × g por 2 min e usado como tal. Todas as etapas foram realizadas em condições estéreis.

3.3.5.2 CULTURA DE CÉLULAS

As células osteogênicas da linhagem OSTEO-1 (calvárias de rato) foram cultivadas em DMEM suplementado com soro fetal de bovino (10% v) e antibióticos (penicilina 100U/mL; estreptomicina 0,1 mg.mL⁻¹). As culturas foram mantidas a 37 ± 2 ° C em atmosfera com 5% de CO₂ e, quando em 80-90% de confluência, foram tripsinizadas para se soltarem do fundo da garrafa. A tripsina foi neutralizada pela adição de DMEM com soro fetal de bovino. As células foram utilizadas para o teste de citotoxicidade.

3.3.5.3. TESTE DE CITOTOXICIDADE

O efeito citotóxico das amostras foi avaliado pelo ensaio MTT (ISO 10993-5). Como tal, a suspensão de células foi centrifugada por 3 min a 1200xg e transferida para uma placa de 96 poços em uma densidade celular de 1 × 10⁴ células / poço. As placas de 96 poços foram incubadas por 24h para adesão celular completa. Posteriormente, as células foram tratadas com 100 µL de controle positivo (100 % vol, DMSO), 100 µL de controle negativo (DMEM) e 100 µL dos extratos de 45S5 ou 45S5B a 100, 50, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63 e 0,32 % em DMEM. Após 48 h, a suspensão foi removida e as placas foram lavadas com PBS. Cem microlitros de MTT (1mg.mL⁻¹ em PBS) foram adicionados a cada poço. As microplacas foram incubadas a 37 ± 2 ° C por 4h, protegidas da luz. Essas etapas foram realizadas em condições estéreis. Os cristais de formazan

foram solubilizados pela adição de 50 µL de DMSO por poço. A absorbância foi lida a 570 nm num espectrofotômetro Bio-Rad Modelo 550. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicata. A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle negativo e representa a citotoxicidade de cada tratamento, como segue: % de viabilidade celular = [(ABS de controle negativo - ABS de amostras tratadas) / (ABS de controle negativo)] × 100].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARO DO BIOVIDRO

A reação de policondensação do processo sol-gel utilizada para obtenção do gel de siloxano, que corresponde à matriz do biovidro é representada na Figura 3.

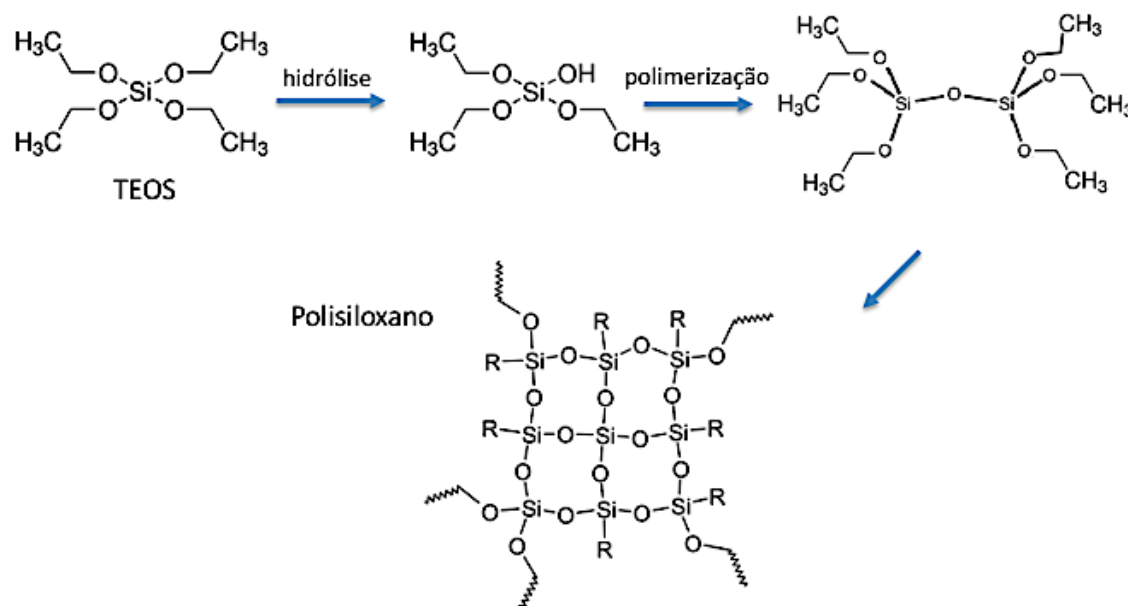


Figura 3. Esquema simplificado da reação química de formação do gel a partir do sol, com hidrólise das moléculas de TEOS, permitindo a polimerização

por condensação das moléculas em macromoléculas que formam a rede tridimensional do polisiloxano.

As etapas do processo sol-gel são representadas na Figura 4 através de fotografias digitais obtidas durante o processo. A Fig. 4 A e D mostram os componentes de 45S5 e 45S5B em seu estado gel, Fig. 4 B e mostram 45S5 e 45S5B, respectivamente, gelificados. E ambos, a adição do Na_2PO_3 levou a um rápido aumento da viscosidade, que pode ser atribuída à formação de uma rede de cadeia de polifosfato, favorecendo a estabilidade do sistema (sem separação de fases) até a geleificação. O aumento da viscosidade contribui para aumentar a homogeneidade do material, uma vez que eles evitam a separação de fases até secar. Fig. 4 C e F mostram o aspecto visual dos respectivos pós após tratamento térmico.

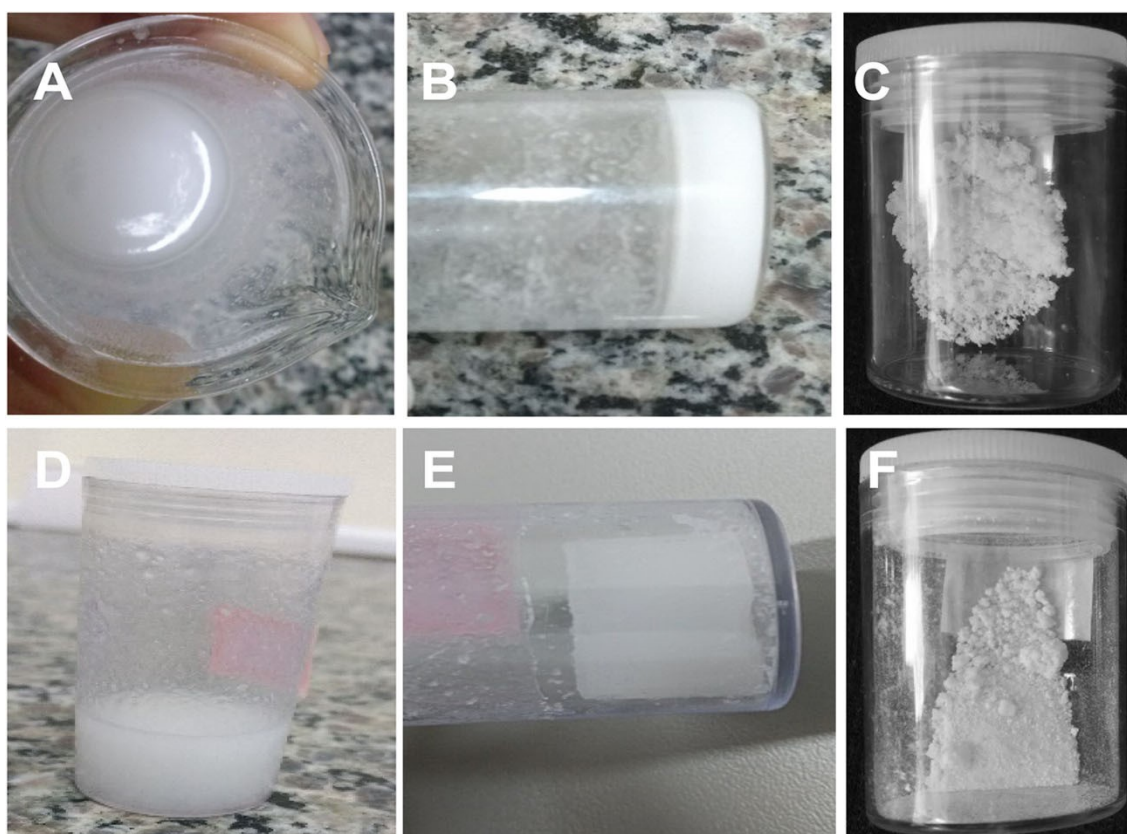


Figura 4. Fotografias digitais após o processo de preparação sol-gel de 45S5, mostrando a mistura líquida (A), a mistura gelificada (B) e o pó de biovidro

tratado termicamente (C), e para 45S5B mostrando a mistura de sol gel líquido (D), a mistura gelificada (E) e o pó de biovidro tratado termicamente (F).

4.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO BIOVIDRO EM SBF (FORMAÇÃO DE HIDROXIAPATITA - BIOATIVIDADE *IN VITRO*)

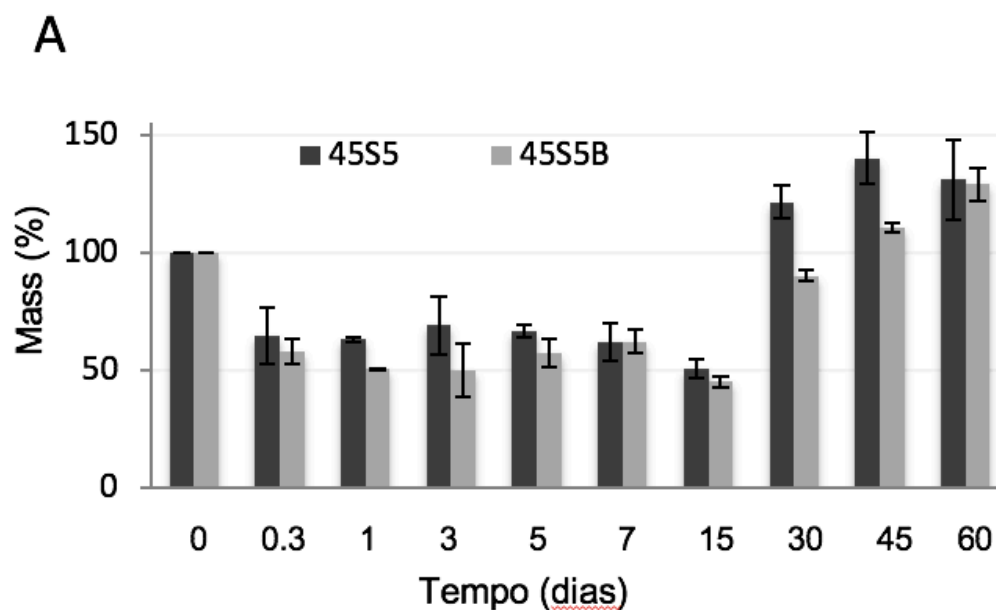
A bioatividade dos materiais foi investigada até 60 dias em SBF. As alterações na massa inicial, espectroscopia FTIR, MEV e DRX indicaram a formação de hidroxiapatita.

A variação de massa das amostras foi medida nos tempos 0 e 8 h, 1, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias e os resultados são mostrados na Figura 5 (A). Os biovidros mostraram uma rápida perda de massa até 8 horas, aproximadamente 25 e 40% em peso para 45S5 e 45S5B, respectivamente. Então, a massa manteve-se constante para ambas as amostras até 15 dias. A perda de massa pode ser atribuída à dissolução dos sais solúveis em SBF e a manutenção da massa pode ser possivelmente causada pelo equilíbrio entre a dissolução de sais e a formação / deposição de hidroxiapatita na superfície das partículas de biovidro. Após 15 dias, a massa aumenta drasticamente até 60 dias, atingindo cerca de 50% do ganho de massa. Este resultado pode ser atribuído à forte característica de bioatividade dos biovidro em SBF, na qual os sais do meio líquido (SBF) claramente alteraram o equilíbrio preferencialmente para a formação de hidroxiapatita, favorecida pela troca de íons do SBF, a fonte de sais. A bioatividade do 45S5 foi ligeiramente superior a 45S5B após 30 dias de tempo.

A variação do pH do SBF após 7, 15, 30, 45 e 60 dias em contato com os biovidros é mostrada na Figura 5 (B). O pH da SBF foi de 7,4 no início e seu comportamento geral para ambos 45S5 e 45S5B aumenta ligeiramente até 30 dias, seguido por uma diminuição dos valores de pH até 60 dias, mas a variação manteve-se dentro do intervalo de pH de 6,5 e 8,0. A variação do pH é atribuída à hidrólise dos componentes das amostras, ou seja, os sais em seu estado puro e seus correspondentes óxidos, gerados por tratamento térmico. O aumento nos valores de pH é devido à dissociação de sais como sódio e cálcio em meio líquido aquoso. 45S5 trocam Ca^{2+} e Na^+ pelos prótons de SBF. A substituição de H^+ da SBF por Ca^{2+} ou Na^+ leva ao aumento nos valores de pH, leva a diminuição dos

prótons dissociados em SBF. O pH do 45S5B foi menor que o 45S5 em todos os momentos, possivelmente devido à hidrólise do óxido de boro levando à formação do ácido nativo e à diminuição do pH. A variação do pH foi baixa porque a SBF foi utilizada em grande excesso quando comparada à pequena quantidade de biovidro na tentativa de simular a dinâmica dos fluidos corporais. Os sais foram capazes de manter a faixa de pH propícia ao crescimento e desenvolvimento das células.

A análise conjunta dos resultados de variação de pH e perda de massa seguida de ganho de massa é coerente com os resultados esperados, pois para a troca de íons do biovidro com o meio SBF resulta em variação de pH, em uma perda de massa inicial devido à dissolução de sais, seguida de precipitação dos sais componentes de ambos os sistemas em forma de hidroxiapatita na superfície dos biovidros. Porém, os resultados de aumento de massa e variação de pH são apenas sugestivos da formação de hidroxiapatita.



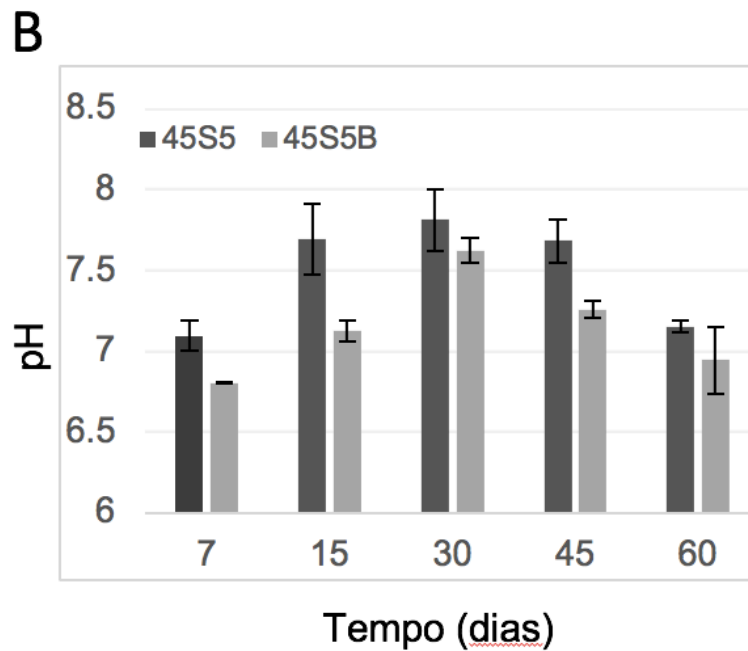


Figura 5. Variação de massa (%) dos biovidros 45S5 e 45S5B após imersão em solução de SBF (A), e as alterações no pH da solução SBF após contato com 45S5 ou 45S5B (B).

4.3 FTIR

O FTIR do 45S5 antes da imersão em SBF mostra o espectro típico de bioquímicos à base de silicato com os principais picos em 1100 e 3375 cm^{-1} relacionados ao alongamento de Si-O e a sobreposição da vibração OH do silanol e da água adsorvida. O pico fraco a 800 cm^{-1} está relacionado à flexão de Si-O, e o pico a 900 cm^{-1} corresponde ao Si-O com um oxigênio não-ponte. O pico de cerca de 1635 cm^{-1} corresponde à água molecular. Após a imersão em SBF, os picos dos espectros 45S5 mudaram drasticamente, revelando mudanças em sua estrutura. O espectro de 45S5 imerso por 8 h em SBF mostrou o aparecimento do pico em torno de 650 cm^{-1} , indicando a formação de hidroxiapatita, de acordo com dados da literatura (EGGLI et al., 1987). O desaparecimento do pico a 900 cm^{-1} relacionado ao Si-O com um oxigênio não-

ponte e o aparecimento do pico a 3180 cm^{-1} pode estar relacionado a mudanças na estrutura dos grupos OH do Si-OH, possivelmente relacionados com a formação de $\text{Si-O}^-\text{Na}^+$. O desaparecimento dos picos a 3400 e 1635 cm^{-1} indica a perda de água e a ligação do OH do Si-OH aos sais do SBF, como o sódio, formando estruturas como Si-O-Na. Após 60 dias de imersão, apenas os picos em 1034 e 1090 cm^{-1} foram encontrados, indicando mudanças profundas na estrutura baseada em siloxano, evidenciada pelo aumento do pico de vibrações de Si-O. As contribuições de fosfato, em cerca de $1000 - 1100\text{ cm}^{-1}$ são sobrepostas pelos picos de silicato e não são separadas como vibrações individuais de infravermelhos, no entanto as alterações nesta região do espectro podem ser atribuídas às vibrações $\text{P} = \text{O}$ do grupo fosfato da hidroxiapatita (EGGLI et al., 1987).

O espectro FTIR 45S5B (Fig. 3) mostra picos de vibração semelhantes dos grupos químicos de 45S5, como esperado, uma vez que a maioria dos componentes não muda, exceto a inclusão de boro na formulação 45S5B. No entanto, picos de vibração de boro são claramente mostrados no espectro 45S5B. Os picos típicos de vibrações de borato estão relacionados a estruturas triangulares de boro (BO_3) ou tetraédricas (BO_4) de diboratos, tetraboratos e triboratos (SOUBELET et al., 2018; DELIORMANLI, 2013). O borato tetraédrico mostra vibrações de estiramento assimétricas na faixa de $800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (LIN et al., 2014) que aparece na Figura 3B a cerca de 1032 cm^{-1} , sobrepostas ao pico de vibração Si-O. A absorção de frequência da estrutura de borato triangular (BO_3 e BO_2O) aparece em cerca de $1200\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ e é evidenciada na Fig. 3B pelas bandas de absorção a $1350\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ e as vibrações de flexão ou modos de deformação do borato apareceram 700 cm^{-1} (PIRAYESH and NYCHKA, 2013). A imersão em SBF por 8 h revelou profundas alterações no espectro claramente relacionadas à formação de hidroxiapatita evidenciada pelo aparecimento dos picos duplos em 643 e 660 cm^{-1} , conforme descrito para 45S5. Além disso, as ressonâncias atribuídas à rede de vidro de siloxano (Si-O) enfraqueceram e as vibrações de absorção relacionadas ao grupo fosfato ($\text{P} = \text{O}$), em torno de 1032 cm^{-1} , levaram a mudanças profundas nessa região dominante do espectro (EGGLI et al., 1987). As vibrações em 1390 cm^{-1} podem ser atribuídas ao B-O.

A análise de FTIR indicou a presença de hidroxiapatita na superfície dos biovidros 45S5 e 45S5B após imersão em SBF, de acordo e confirmando os resultados de ganho de massa observados nos ensaios de biotatividade in vitro.

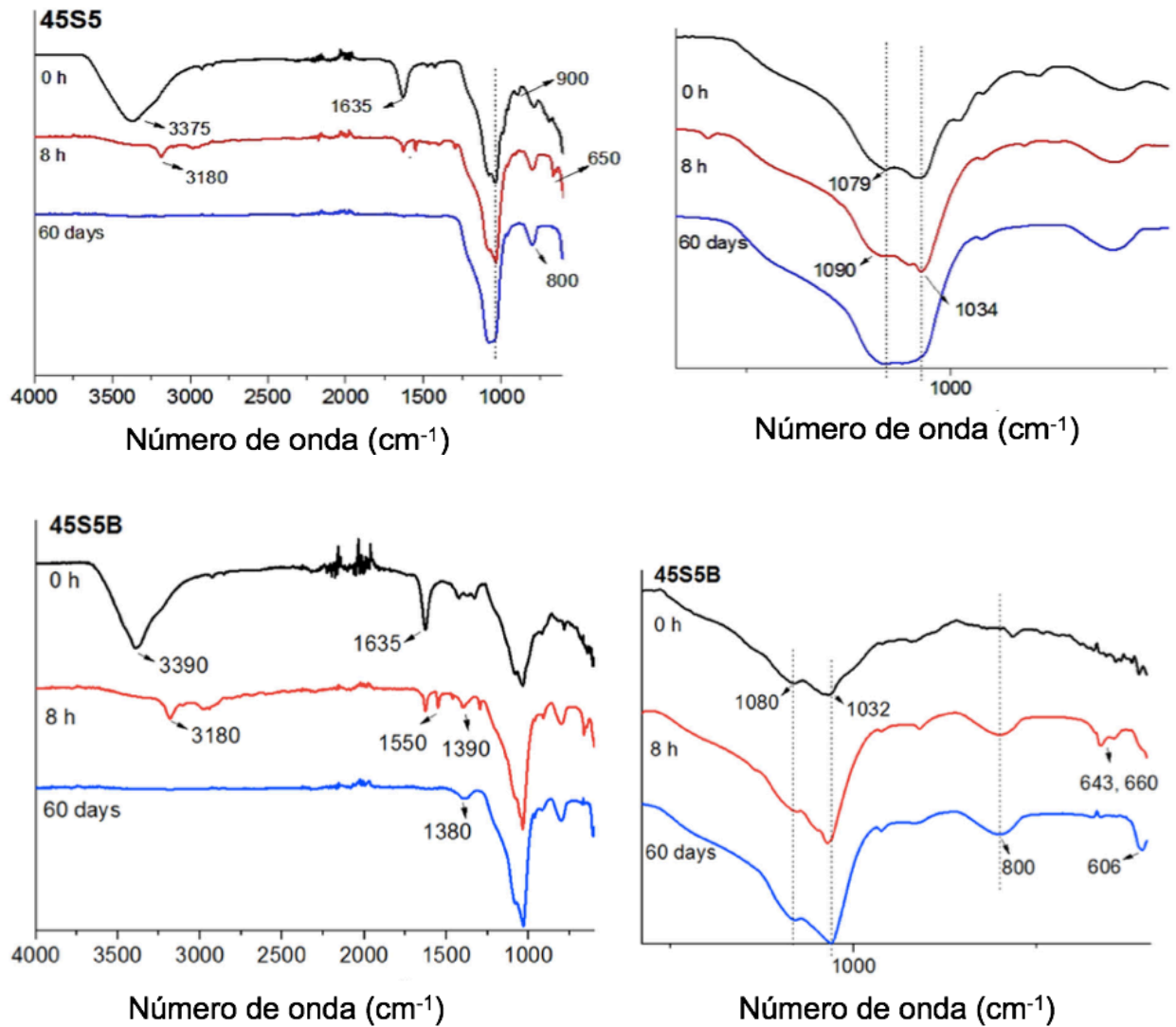


Figura 6. Resultados FTIR de 45S5 e 45S5B antes da imersão em SBF, 0h e após 8h e 60 dias imersos em SBF.

4.4 MEV

As Figuras 7 e 8 mostram as imagens de MEV do 45S5 e 45S5B, respectivamente, em função do tempo de imersão das amostras de biovidro em SBF. O processamento de sol-gel gerou partículas com superfícies lisas, como representado na Fig. 7 (A e B) e 8 (A e B) com altas ampliações. A estrutura dos biovidros mudou drasticamente em SBF em ambas as amostras, começando pela corrosão das partículas causada pela dissolução de sais no meio líquido, seguida pela precipitação de cristais de hidroxiapatita na superfície dos biovidros. A imersão de 45S5 em SBF por 8 horas deu origem a poros na superfície, indicando a dissolução parcial de componentes do biovidro devido à troca de íons com o ambiente no qual foi imerso (SBF). Quando observado em maior magnificação mostram uma grande quantidade de pequenos cristais precipitados. O crescimento de cristais aumentou com o tempo, conforme representado na Fig. 7 E, F, G e H, bem como o tamanho e número de poros, evidenciados na Fig. 7 G e H. A formação de cristais na superfície dos biovidros aumenta sua massa, indicando que as imagens de MEV confirmam os resultados de mudança de massa mostrados na Fig. 5, com perda no início do experimento e ganho após 2 dias até o fim do experimento. O comportamento de 45S5B foi bastante semelhante ao 45S5, porém a morfologia de 45S5B foi sutilmente diferente, mostrando maiores poros e maiores cristais quando comparado ao 45S5. Curiosamente, as estruturas dos cristais mostraram morfologia semelhante para ambos os biovidros, bem como o padrão de deposição na superfície dos biovidros, mostrando tamanhos e formas semelhantes.

Os resultados de MEV estão de acordo com os resultados de perda de massa por dissolução de sais componentes dos biovidros, no início do ensaio e também com o ganho de massa, em função do tempo de imersão. Os cristais precipitados na superfície dos biovidros são possivelmente hidroxiapatita, porém através destas imagens não é possível levantar dados a respeito da composição dos cristais.

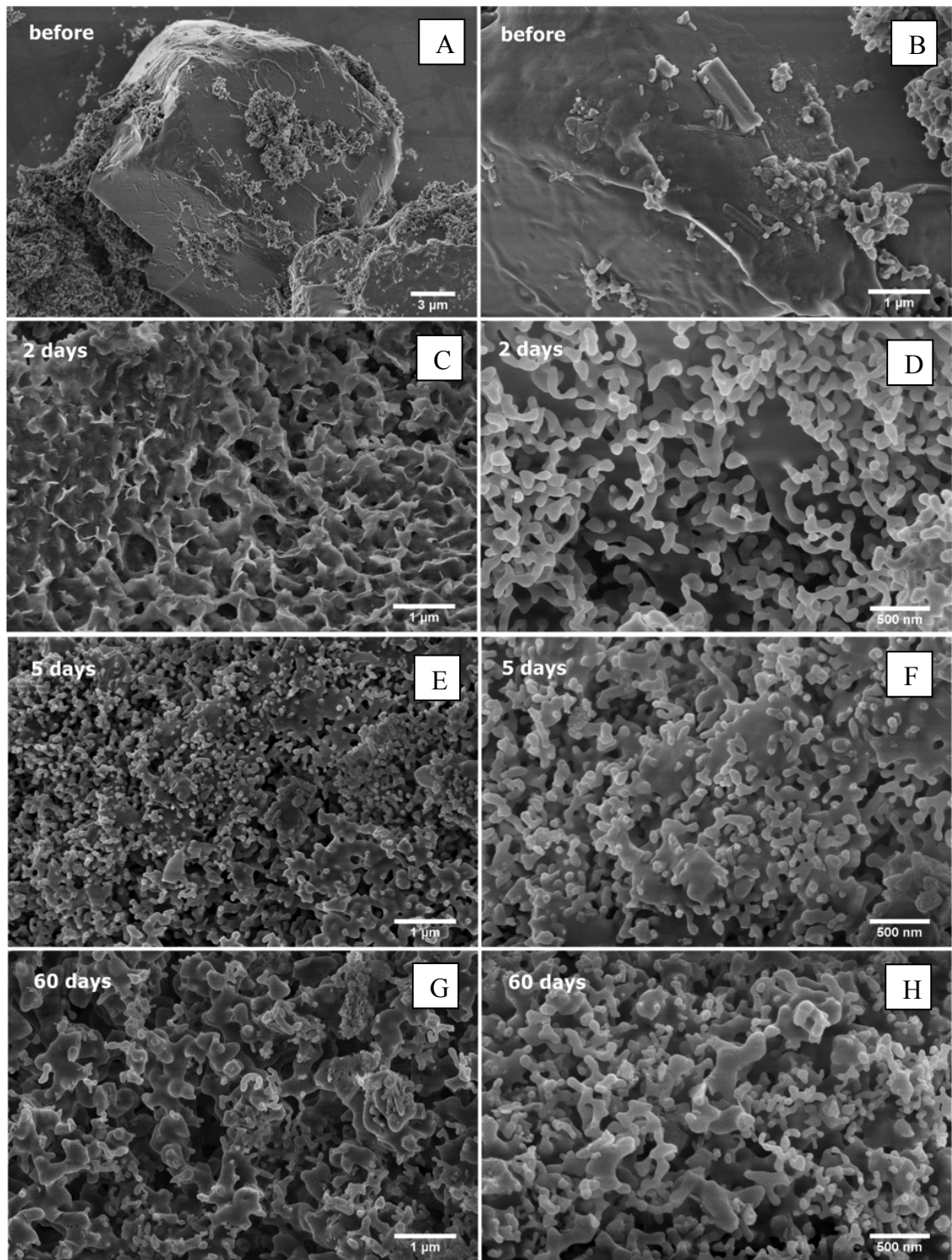


Figura 7. Imagens de MEV de 45S5 antes da imersão em SBF (A, B) e após 2 dias (C, D), 5 dias (E, F) e 60 dias (G, H) em SBF. Barras de escala - 1 um - A, C, E G e 500 nm - B, D, F e H.

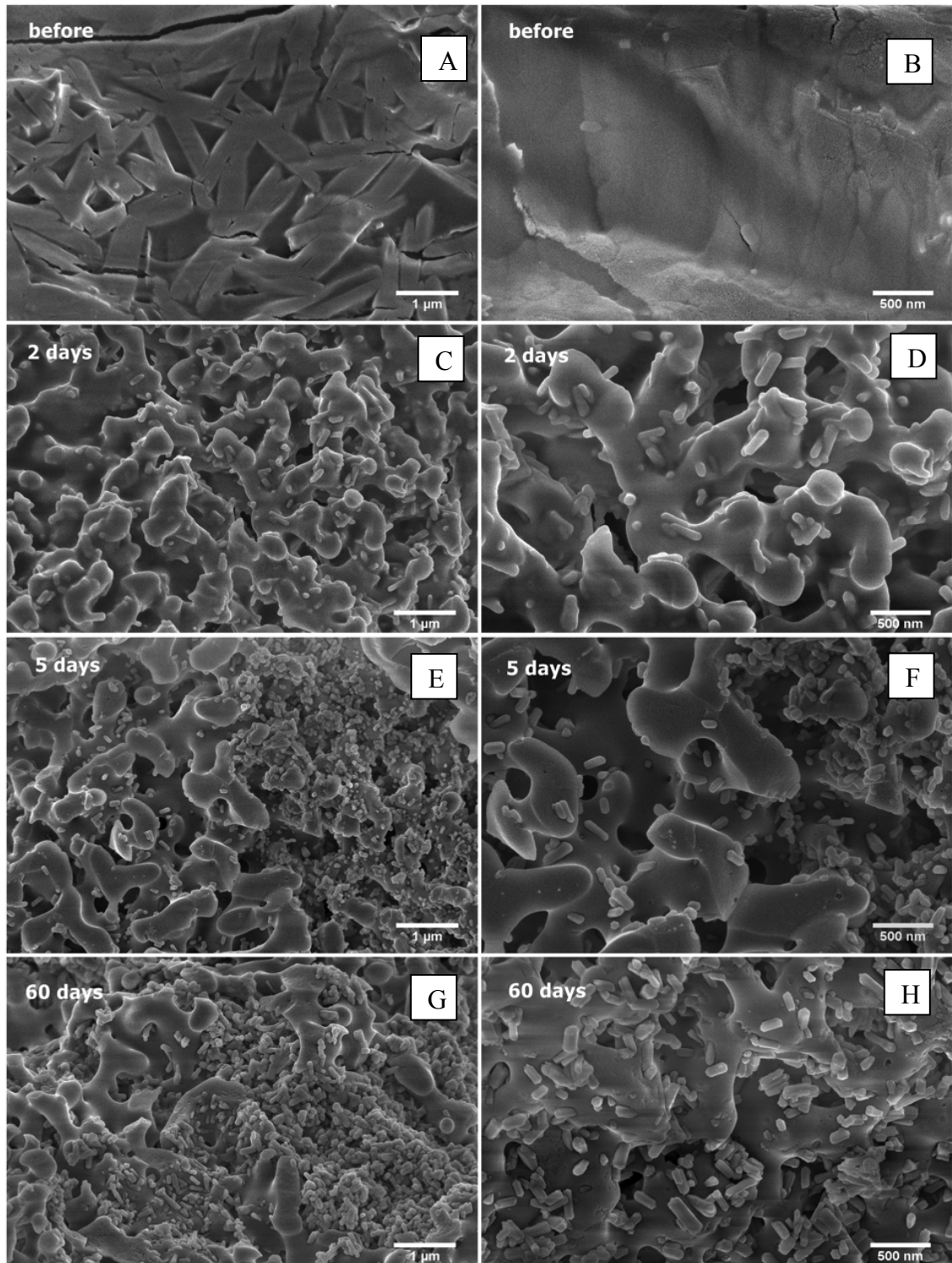


Figura 8. Imagens MEV de 45S5B antes da imersão em SBF (A, B) e após 2 dias (C, D), 5 dias (E, F) e 60 dias (G, H) em SBF. Barras de escala - 1 um - A, C, E G e 500 nm - B, D, F e H.

4.5 DRX

A Figura 9 mostra os difratogramas de DRX de 45S5 e 45S5B antes e depois da imersão em SBF por 60 dias. Em geral, os resultados revelaram a deposição de hidroxiapatita na superfície de ambos os biovidros, em total concordância com os resultados de FTIR, confirmando os resultados de MEV e de perda / ganho de massa. O difratograma de DRX de 45S5 e 45S5B (Figura 9), antes da imersão em SBF revelou a presença do pico amorfo a 22° correspondente a Si-OH e os picos cristalinos atribuídos a NaCl formados no processo de precipitação. Os picos a $31,74^\circ$, $45,40^\circ$, $56,50^\circ$ e $75,18^\circ$ corresponderam a 200, 220, 222 e 420 planos cristalinos de NaCl, respectivamente. Estes resultados podem explicar a rápida perda de massa no início dos testes de bioatividade, que podem estar estritamente relacionados à dissolução do NaCl no meio líquido.

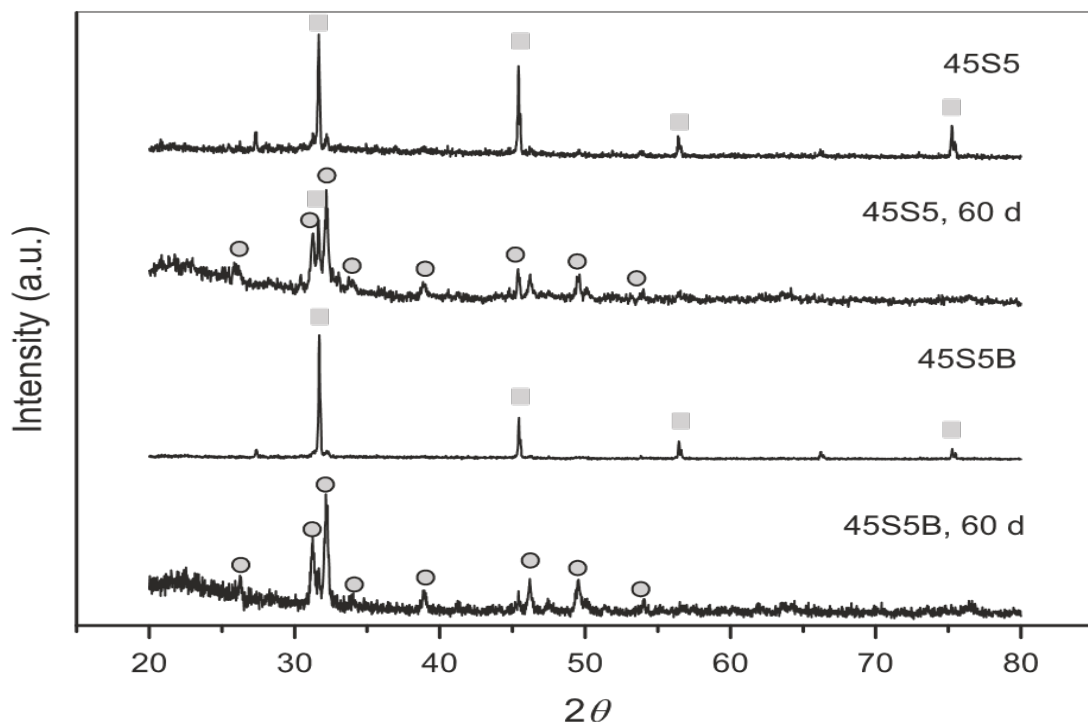


Figura 9. Difratogramas de DRX de 45S5 e 45S5B antes e depois da imersão em SBF por 60 dias, mostrando os picos típicos de hidroxiapatita (“●”) e NaCl (“■”).

Os padrões de 2θ DRX da hidroxiapatita pura são mostrados na Tabela 1 (EGGLI et al., 1987), bem como os dados experimentais de 45S5 e 45S5B após 60 dias de imersão em SBF. Os picos em $2\theta = 31,29^\circ$ e $31,19^\circ$ exibidos nos difratogramas 45S5 e 45S5B, respectivamente, correspondem a $2\theta = 31,74^\circ$ da hidroxiapatita padrão, e os picos a $32,24^\circ$, correspondentes ao plano cristalino (002), são os picos típicos da hidroxiapatita (SHAH et al., 2018). Os picos característicos da hidroxiapatita identificada em 45S5 e 45S5B são exibidos na tabela 1 (SHAH et al., 2018).

(hkl)	(002)	(211)	(112)	(300)	(202)	(310)	(222)	(213)	(004)
pattern[31]	25.80	31.74	32.13	32.85	34.08	39.81	46.71	49.41	53.1
45S5	25.96	31.29	31.74	32.24	34.14	39.90	46.21	49.61	53.92
45S5B	26.30	31.19	31.74	32.24	34.02	39.94	46.19	49.52	54.15

Tabela 1. Os parâmetros de 2 teta (hkl) para o padrão de hidroxiapatita e os valores experimentais para 45S5 e 45S5B após 60 dias de imersão em SBF.

4.6 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE

Utilizou-se o teste de viabilidade MTT para acompanhar o comportamento das células na presença de biovidros 45S5 ou 45S5B, a fim de determinar a concentração capaz de inibir 50 % do metabolismo das células (inhibitory concentration, IC_{50}). Os resultados para as amostras extraídas de 200 mg de biovidro por mililitro de DMEM evidenciaram a característica típica desses materiais, ou seja, sua capacidade de dissociação em meio aquoso, aumentando a força osmótica, levando as células a morrer após 24h. A alta concentração de íons fora das células resultou na difusão da água na tentativa de alcançar o equilíbrio osmótico, levando-os à plasmólise (KÜLTZ e CHAKRAVARTY, 2001). A inibição do metabolismo total foi detectada para ambos os biovidros em meio sem diluição. Estudos com concentrações mais baixas de biovidros, variando de

100 a 0,3 %, levaram ao perfil de inibição de crescimento apresentado na Figura 10, para o qual os valores IC_{50} foram encontrados para as diluições a 8,15 e 7,56% para 45S5 e 45S5B (Fig. 7a), respectivamente. A Figura 10 B mostra os resultados do MTT em que a baixa concentração do biovidro deu origem à intensa cor púrpura, indicando a atividade das enzimas das células vivas na conversão do MTT (amarelo, mostrado no controle positivo, CP) para o seu derivado de formazan (roxo, mostrado no controle negativo, CN).

A Fig. 10 A mostra viabilidade celular (%) após tratamento com 45S5 ou 45S5B. Resultados MTT, mostrando a fotografia digital da placa e dois exemplos de imagens de microscopia óptica das células a 0,3 e 50 % de 45S5 e 45S5B, respectivamente (dimensão celular cerca de 30 μ m). NP = controle negativo, PC = controle positivo, diminuição gradual da cor associada ao aumento gradual da concentração de biovidro indica a morte celular de acordo com a concentração. Estes resultados mostraram a necessidade de altas concentrações de biovidro para inibir 50 % do metabolismo celular, indicando seu baixo efeito citotóxico, de acordo com o caráter não tóxico dos biovidros em geral.

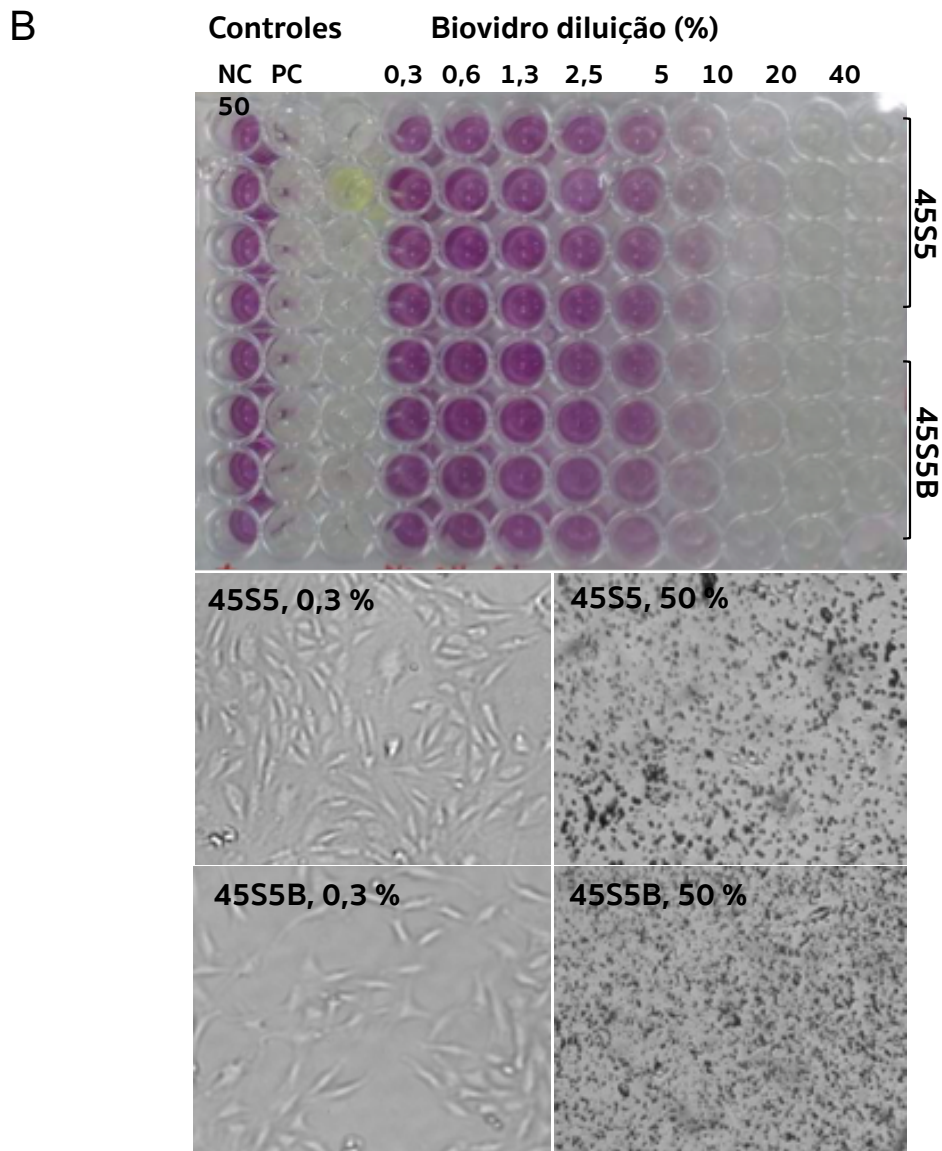
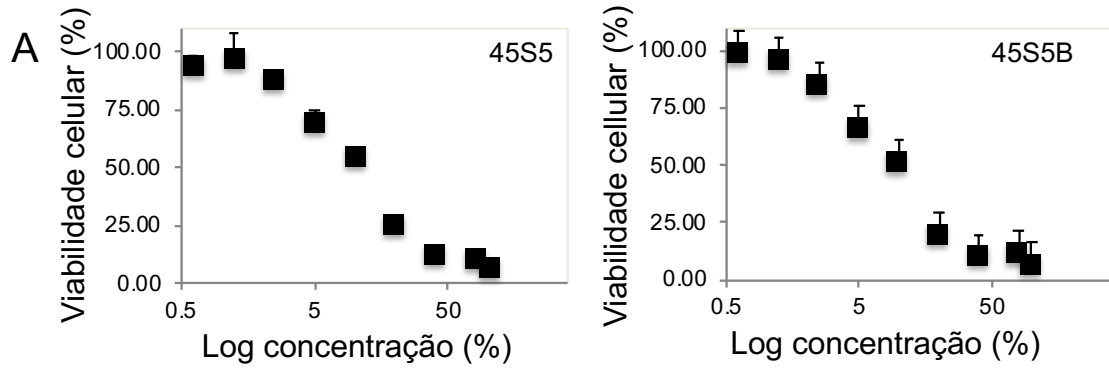


Figura 10. A - Viabilidade celular (%) após tratamento com 45S5 ou 45S5B. **B** - resultados de MTT, mostrando a micrografia digital da placa e dois exemplos de microscopia óptica imagens das células em 0,3 e 50 % de 45S5 e 5S5B, respectivamente. NP = controle negativo, PC = positivo na superfície.

Em geral, os resultados indicaram o sucesso do método sol-gel para a preparação dos biovidros 45S5B e 45S5 a partir de sais solúveis em água. As caracterizações revelaram que o biovidro à base de boro 45S5B, preparado pela tecnologia sol-gel, apresentou propriedades semelhantes ao biovidro 45S5, especialmente sua capacidade de estimular a formação de hidroxiapatita.

Essa propriedade é a mais importante para a osteointegração no processo de cicatrização óssea, uma vez que a hidroxiapatita é o material que compõe o osso. Assim, a sua deposição na superfície do biovidro 45S5B melhora a sua capacidade de integração com osso. Além disso, a tecnologia de sol-gel e os sais solúveis em água representam uma alternativa potencial ao método convencional para a preparação de biovidro.

5. CONCLUSÕES

O processo sol-gel foi usado com sucesso para a preparação do biovidro 45S5B à base de boro, bem como para a preparação do 45S5 clássico. A caracterização do biovidro mostrou a eficiência do processo sol-gel para gerar este biovidro à base de boro, usualmente preparado tratamento térmico e tratamento de óxidos como material de partida. A estrutura química foi analisada por espectroscopia FTIR antes e depois da imersão em SBF para acompanhar seu comportamento em relação à formação de hidroxiapatita. Os resultados indicaram a formação de grandes quantidades de hidroxiapatita, demonstradas pelo ganho de massa tanto para 45S5 quanto para 45S5B em SBF e também por imagens de MEV, indicando sua alta bioatividade. O 45S5B mostrou um efeito citotóxico similar ao 45S5 nas condições testadas contra células eucariotas OSTE01 *in vitro*, um resultado preliminar que sugere ser seguro para o desenvolvimento de seus materiais baseados em aplicações biológicas.

6. BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ALTAIR, D. A.; CARLOS, F. M.; MARCIO, B. et al.. **Bone biology: the review of literature**. REVISTA IMPLANTNEWS, 2007;4(6):659-62.

ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. **Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog**. J Clin Periodontol, 2005; 32 (b): 212-218.

ARAÚJO, M. G.; SUKEKAVA, J. L.; WENNTROM, J. L.; LINDHE, J. **Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog**. J Clin Periodontol, 2005; 32(a): 645-652.

BI, L.; RAHAMAN, M. N.; DAY, D.E.; BROWN, Z. et al.. **Effect of bioactive borate glass microstructure on bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in a rat calvarial defect model**. Acta Biomater, 2013; 9:8015–8026.

DANTAS, T. S. et al.. **Bone Graft Materials and their Application in Dentistry**. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde 2011;13(2):131-5.

DELIORMANLI, A. M. **Size-dependent degradation and bioactivity of borate bioactive glass**. Ceram Int, 2013; 39:8087–8095.

DEVLIN, H.; SLOAN, P. **Early bone healing events in the human extraction socket**. Int J Oral Max Surg, 2002; 31: 641-645.

EGGLI, O. S.; MULLER, W.; SCHENK, R. K. et al.. **Biomaterials and Clinical Application**. Amsterdam: Elsevier Science Publishing; 1987. P. 53.

FARR, J. N.; KHOSLAA, S. **Skeletal changes through the lifespan— from growth to senescence.** Nat Rev Endocrinol, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.89>.

FU, H.; FU, Q.; ZHOU, N. et al.. ***In vitro* evaluation of borate-based bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication method.** Materials Science and Engineering 2009; C (29):2275–2281.

GHOLAMI, A. G.; NAJAFI, B, et al.. **Clinical, histologic and histomorphometric evaluation of socket preservation using a synthetic nanocrystalline hydroxyapatite in comparison with a bovine xenograft: a randomized clinical trial.** Clin Oral Imp Res. 2011; 23: 1-7.

HABIBOVIC, P. et al.. **Osteoinductive biomaterials-properties and relevance in bone repair.** J Tissue Eng Regen Med 2007; 1: 25-32.

HABIBOVIC, P. et al.. **Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes.** J Orthop Res 2008; 26: 1363-70.

HABRAKEN, W.; HABOVIC, P.; EPPLE, M.; BOHNER, M. **Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?.** Mater Today, 2016; 19:69–87.

HANNINK, G.; CHRIS, J. J. **"Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration?."** *Injury* 42, 2011. S22-S25.

HENCH, L. L. **The story of Bioglass®.** J Mater Sci: Mater Med, 2006; 17:967–978.

HENCH, L. L. et al.. **Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials.** J Biomed Mater Res, 1971; 5:117–141.

ISO 10993-5 (2009). **Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity.**

JONES, A. C. et al.. **The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth.** *Biomaterials* 2009; 30:1440–1451.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

KOKUBO, T. et al.. **Novel bioactive materials with different mechanical properties.** *Biomaterials*, 2003; 24:2161–2175.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran – **Patologia – Bases Patológicas das Doenças.** 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KÜLTZ, D.; CHAKRAVARTY, D. **Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98:1999–2004.

LI, R.; CLARK, A. E.; HENCH, L. L. **An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing.** *J Appl Biomater*, 1991; 2:231–239.

LIN, Y. et al.. **Angiogenic effects of borate glass microfibers in a rodent model.** *J Biomed Mater Res— Part A*, 2014; 102:4491–4499.

LUCACEL, C. R.; TRANDAFIR, D. L.; RADU, T. et al..**Synthesis, characterisation and in vitro evaluation of sol-gel derived SiO₂-P₂O₅-CaO-B₂O₃ bioactive system.** *Ceram Int*, 2014; 40:9517–9524.

MACARI, M. et al.. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte.** Jaboticabal: FUNEP/UNESP. 2002: p. 375.

MEKLE, M. C. et al.. **The synthesis of collagenase, gelatinase- A (72 KDa) and B (95 KDa). And TIMP-1 and -2 by human osteoblast from normal and arthritic bone.** *Bone* 1995; 17:255-60.

NORAKER. **The bioglass company, France.** Acessado em 03 de dezembro de 2019. <http://noraker.com/bioactive-glass/13>

ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S. -Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – UFMG, Rio de Janeiro: Cultura Médica. Livro: Biomaterias: Fundamentos e Aplicações. Edição 1, Cap. 3, p.72-73, 2006.

PAZARÇEVIREN, A. E.; TAHMASEBIFAR, A.; TEZCANER, A. et al.. **Investigation of bismuth doped bioglass/graphene oxide nanocomposites for bone tissue engineering.** Ceram Int, 2018; 44:3791– 3799.

PIERE, A. C., 1998. Introduction to sol-gel processing. Boston: Kluwer Academic Publishers.

PIRAYESH, H.; NYCHKA, J. A. **Sol-gel synthesis of bioactive glass-ceramic 45S5 and its *in vitro* dissolution and mineralization behavior.** J Am Ceram Soc, 2013; 96:1643–1650.

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. Química Nova, vol. 38, 957-971, 2015.

RATNER, B. D. (2004). **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.** Amsterdam, Elsevier Academic Press. <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=286657>.

RODELLA, L. F.; FAVERO, G.; LABANCA, M. **Biomaterials in maxillofacial surgery: Membranes and grafts.** Int J Biomed Sci, 2011; 7:81–88.

SHAH, F. A.; CZECHOWSKA, J. **Bioactive glass and glassceramic scaffolds for bone tissue engineering.** In: Bioactive glasses, 2018; pp 201–233. Ed. Heimo Ylänen. Woodhead Publishing, Elsevier, second edition, Kidlington, UK, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100936-9.00011-3>.

SHANKHWAR, N.; SRINIVASAN, A. **Evaluation of sol-gel based magnetic 45S5 bioglass and bioglass-ceramics containing iron oxide.** Mater Sci Eng C, 2016; 62:190–196.

SIQUEIRA, R. L; ZANOTTO, E.D. **Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade.** Quím. Nova, São Paulo, v. 34, n. 7,1231-1241, 2011 .

SOUBELET, C. G. et al.. **Sintering, microstructure and hardness of Y-TZP- 64S bioglass ceramics.** Ceram Int, 2018; 44:4868–4874.

ŠUPOVÁ, M. **Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: a review.** Ceram Int, 2015; 41:9203–9231.

TROMBELLI, L. et al.. **Modeling and remodeling of human extraction sockets.** J Clin Periodontol 2008; 35: 630-639.

VASSILAKOPOULOU, A. et al.. **Synthesis and characterization of calcium oxyborapatite with bimodal porosity.** J Sol-Gel Sci Technol 2016; 78:339–346.

ZIJDERVELD, A. S.; ZERBO, I. R.; VAN DEM BERGH, J. P. et al.. **Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb®) alone compared to autogenous bone grafts.** Int J Oral Maxillofac Implants 2005; 20:432-40.

WENZ, B., OESCH, B., HORST, M. . **Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone.** Biomaterials 2001; 22:1599–1606.