



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA**  
**NÍVEL: MESTRADO ACADÊMICO**

**AVALIAÇÃO DE UM BIOVIDRO A BASE DE BORATO ELABORADO COM  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PENTÓXIDO DE FÓSFORO**

Maringá

2018

BRUNA MILHOMENS DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DE UM BIOVIDRO A BASE DE BORATO ELABORADO COM  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PENTÓXIDO DE FÓSFORO**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós Graduação em Odontologia  
Integrada da Universidade Estadual de  
Maringá como requisito para obtenção  
de título de Mestre em Odontologia  
Integrada

Orientadora:  
Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Luzmarina Hernandes

Maringá

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S725a Sousa, Bruna Milhomens de  
Avaliação de um biovidro a base de borato  
elaborado com diferentes concentrações de pentóxido  
de fósforo / Bruna Milhomens de Sousa. -- Maringá,  
2018.  
60 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luzmarina Hernandes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia Integrada, 2018.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Osteogênese. 3.  
Espectroscopia de infravermelho com transformada de  
Fourier. I. Henandes, Luzmarina, orient. II.  
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências  
da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Odontologia Integrada. III. Título.

CDD 21.ed. 617.6

AHS-CRB-9/1065



**Universidade Estadual de Maringá**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada**



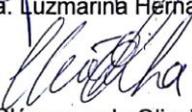
ATA Nº 091

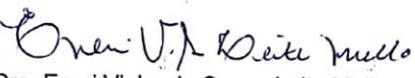
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE BRUNA MILHOMENS DE SOUSA, DISCENTE DO CURSO DE MESTRADO, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ (PGO/UEM).

Aos treze dias, do mês de março do ano de dois mil e dezoito, às quatorze horas, no Auditório da UPA/UEM (Unidade de Psicologia Aplicada, da Universidade Estadual de Maringá), localizado na Avenida Mandacarú, 1690, reuniu-se a Banca Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. Luzmarina Hernandes, do Departamento de Ciências Morfológica / Universidade Estadual de Maringá (DCM/UEM); Prof. Dr. Cléverson de Oliveira e Silva, do Departamento de Odontologia / Universidade Estadual de Maringá (DOD/UEM); e, Profa. Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello, do Departamento de Ciências Morfológica / Universidade Estadual de Maringá (DCM/UEM), sob a presidência da primeira, a fim de proceder à arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **Bruna Milhomens de Sousa**, intitulada: "Avaliação de um biovidro a base de borato elaborado com diferentes concentrações de pentóxido de fósforo". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Banca Examinadora, tendo recebido o conceito final: A e foi aprovada. A aluna, após a defesa, terá o prazo de 30 (trinta) dias para entregar à Secretaria do PGO: 03 (três) exemplares corrigidos da dissertação de Mestrado; 1 CD contendo a Dissertação (formato Word e PDF) previamente corrigida e aprovada pelo orientador juntamente com os formulários utilizados para a pesquisa, o banco de dados da pesquisa (versão Word ou Excel); comprovação de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa, quando pertinente; os artigos enviados para publicação ou em andamento (versão Word e PDF) gerados durante o mestrado; e, cópia da carta de submissão do artigo à publicação em periódico indexado em bancos de dados reconhecidos (LILACS, SCIELO, MEDLINE e ISI), referente à dissertação defendida. Nada mais havendo a relatar, a Banca Examinadora considera encerrados os trabalhos, lavrando a presente ata que após lida e apreciada, segue devidamente assinada.

Maringá, 13 de março de 2018.

  
Profa. Dra. Luzmarina Hernandes

  
Prof. Dr. Cléverson de Oliveira e Silva

  
Profa. Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial aos meus pais, irmãos e ao meu marido, Arthur, por todo o apoio e pelo amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda **minha família** por ter sido meu alicerce ao longo desses anos. Em especial, à minha tia avó, **Maria das Neves Costa**, pelo amor e por todo o apoio.

Aos meus pais, **Vera Lúcia Costa Milhomens de Sousa** e **Júlio César Amaral de Sousa**, por me ensinarem a sempre lutar pelos meus objetivos, pelos conselhos, e por sempre terem sido o meu suporte. Mesmo longe eu sempre tive vocês ao meu lado.

Aos meus irmãos, **Júlio César Amaral de Sousa Júnior** e **Júlia Milhomens de Sousa**, que mesmo com a distância, sempre cuidaram de mim e me apoiaram. Sem vocês eu estaria incompleta.

Ao meu marido, **Arthur da Costa Leite Sousa**, por ter compreendido o meu desejo de fazer o mestrado longe, por acreditar nos meus sonhos, por sempre ter sido meu companheiro e melhor amigo, e por sempre me fazer acreditar em mim mesma. Eu não teria conseguido sem o seu apoio.

À minha sogra, **Benedita de Jesus Leite Nunes**, que sempre me deu apoio, agindo como uma mãe para mim.

À minha melhor amiga e eterna dupla, **Luisa Moura Fialho**, pelo período em que dividimos apartamento e pela amizade que superou os momentos de distância. Obrigada pelo companheirismo e por me fazer confiar na minha capacidade de vencer os desafios.

À minha grande amiga, **Raiana Costa Silva**, pelo apoio e palavras de incentivo mesmo à distância.

Agradeço à minha orientadora, **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luzmarina Hernandes**, pela paciência e dedicação. Obrigada pelos momentos de conversa, pelo carinho e pelo cuidado. Aprendi muito mais nesses dois anos do que poderia imaginar, foi um período de crescimento pessoal e profissional. Serei eternamente grata.

Ao **Prof Dr. Cléverson de Oliveira e Silva**, pelo conhecimento e experiência compartilhados ao longo desses quatro anos de convívio, pelo exemplo como profissional e por ter dedicado tempo para enriquecer este trabalho.

À **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eneri Vieira de Souza Leite e Mello**, pelo convívio sempre agradável e pela valiosa contribuição neste trabalho.

Aos **Professores dos Departamentos de Odontologia e de Ciências Morfológicas** pelos ensinamentos e pela convivência ao longo desses anos.

À **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Losi Alves de Almeida** pelo carinho e pela orientação durante o estágio docente.

Ao **Prof Dr. Roberto Massayuki Hayacibara** e ao **Prof Dr. Mauricio Guimarães Araújo** pelas oportunidades de aprendizado e pela disponibilidade em discutir as minhas dúvidas.

Ao doutorando **Pablo Portes** e sua orientadora, **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Francielle Sato**, pelo apoio e pelos esclarecimentos em relação ao material avaliado.

À **Profª Drª Taqueco Teruya Uchimura** pela contribuição na análise dos dados.

Às **técnicas Maria Euride Carlos Cancino e Maria dos Anjos Moreira Fortunato e à Maria Ângela Moreira** por toda a paciência, pelo conhecimento compartilhado e pelo suporte nos momentos de dificuldade. O auxílio de vocês foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Eu sempre recordarei do carinho com o qual fui recebida no laboratório. Vocês trabalham com amor e isso faz toda a diferença.

Aos **meus colegas do laboratório** pelos momentos compartilhados, pelas conversas e risadas que fizeram com que o laboratório se transformasse em uma extensão da minha casa. Aqui destaco **Larissa Schneider**, pelos ensinamentos e pelos momentos de descontração.

Aos parceiros de pesquisa **Marcelo Augusto Seron, Bruno Henrique Miotto Stabile, Gabriela Prado, Jéssica Naiara e Douglas Bolzon Scatolim**, que contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa. Em especial aos meus amigos **Alessandro Gavazzoni e Camila Giroto**, por toda a ajuda no desenvolvimento das atividades laboratoriais e pelo apoio nos momentos de dificuldade, mas, sobretudo, pela amizade que vai além dos portões da UEM. Muito obrigada por tudo!

Aos **meus colegas de mestrado**, pelo conhecimento e pelas dificuldades compartilhadas. Aqui em especial à **Mayra Senise Soda Graziano**, pela amizade, pelo carinho e pela parceria ao longo desses dois anos.

Agradeço aos meus amigos **Aline Ishida, Isabela Silva Rocha, Joana Yumi Teruya Uchimura, Clovis Lamartine de Moraes Melo Neto e Rafael de Oliveira Lazzarin** pela amizade que nasceu na Residência Multiprofissional e que só se fortaleceu ao longo desses quatro anos. Vocês estiveram ao meu lado em todos os momentos, participaram das minhas conquistas e me deram todo o apoio que eu precisava nas horas de dificuldade. Serei eternamente grata por ter tido a oportunidade de conviver com vocês.

Às minhas amigas da Sião, em especial à **Bianca Martins, Caroline Rodrigues de Almeida e à Amanda Hanny Netzlaff Teschke**. Foi através de vocês que eu conheci uma nova vida e sou muito grata por isso. Obrigada pelos cafés, lanches, reuniões, filmes, orações e, sobretudo, pelos momentos em que eu pude compartilhar com vocês meus medos e frustrações mais profundos, sabendo que encontraria apoio e conforto. Que Deus continue abençoando a vida de vocês.

E agradeço, sobretudo, a **Deus**, por ter me abençoado colocando pessoas tão especiais no meu caminho, por me permitir viver cada momento que me trouxe até aqui e por ter estado ao meu lado em cada um desses momentos.

“Esforça-te e tem bom ânimo; não temas,  
nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é  
contigo, por onde quer que andares.”

Josué 1:9

## RESUMO

Os biovidros a base de borato podem ter sua composição modificada objetivando melhorar seu potencial biológico, entretanto o papel do fosfato neste processo ainda não está completamente esclarecido. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biotividade de um biovidro a base de borato, com 0%, 2% ou 4% de fosfato tendo o 45S5 como controle positivo. Análise de absorção de infravermelho via transformada de Fourier foi realizada antes e após imersão das amostras em fluido corporal simulado. O processo de regeneração óssea foi avaliado na calvária de ratos. A região anteriormente ocupada pelo grânulo foi preenchida por um tecido conjuntivo frouxo sobre o qual havia deposição de matriz ou células gigantes. Com 60 dias de observação, o tecido que preenchia o defeito estava mais denso que nos períodos anteriores. Ao logo do período do experimento, ocorreu diminuição na frequência de tecido ósseo primário em todos os grupos. Embora o biovidro sem fosfato tenha apresentado maior bioatividade *in vitro*, o biovidro borato com 2% de fosfato mostrou maior frequência de ilhotas e maior estabilidade, *in vitro* e *in vivo*. Portanto, a concentração de fosfato interfere na dissolução do biovidro e na frequência de formações ósseas.

**Palavras-chave:** Materiais biocompatíveis; Osteogênese; Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

## **ABSTRACT**

Borate-based bioglass may have its composition modified to improve its biological potential, however the role of phosphate in this process is not yet completely understood. The aim of this study was to evaluate the bioactivity of a borate-based bioglass with 0%, 2% or 4% of phosphate using 45S5 as a positive control. Fourier transform infrared absorption analysis was performed before and after immersion of the samples in simulated body fluid. The bone regeneration process was evaluated in the calvaria of male Wistar rats. The space previously occupied by the granule was filled by a loose connective tissue over which there was deposition of matrix or giant cells. At 60 days of observation, the tissue that filled the defect was denser than in previous periods. During the experimental period, there was a decrease in the frequency of primary bone tissue in all groups. Although phosphate-free bioglass showed higher bioactivity *in vitro*, borate-based bioglass with 2% phosphate showed a higher frequency of islets and greater stability, *in vitro* and *in vivo*. Therefore, phosphate content interferes with the dissolution of bioglass and the frequency of bone formation.

**Keywords:** Biocompatible materials; Osteogenesis; Spectroscopy Fourier Transform Infrared

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Frequência de grânulos dos biovidros BV4 (base de borato com 4% de fosfato), BV2 (base de borato com 2% de fosfato), BV0 (base de borato sem fosfato) e 45S5 (base de sílica) de acordo com o tamanho ( $\mu\text{m}$ ).....	23
<b>Figura 2.</b> Procedimento cirúrgico para colocação dos enxertos de biovidro a base de sílica (45S5), borato com 4% de fosfato (BV4), borato com 2% de fosfato (BV2) ou borato sem fosfato (BV0).....	26
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografias representativas dos diferentes tipos de formações ósseas observadas no sítio de regeneração, em defeitos de tamanho críticos na calvária de ratos após enxerto com biovidro a base de sílica (45S5), de borato com 4% de fosfato (BV4), borato com 2% de fosfato (BV2) e de borato sem fosfato (BV0).....	28
<b>Figura 4.</b> Espectros de FTIR-ATR dos biovidros a base de sílica (45S5), de borato com 4% de fosfato (BV4), borato com 2% de fosfato (BV2) e de borato sem fosfato (BV0) antes da imersão em SBF.....	29
<b>Figura 5.</b> Comparação dos espectros de FTIR-ATR dos biovidros a base de sílica (45S5), a base de borato com 4% (BV4), 2% (BV2) ou 0% (BV0) de fosfato, antes (0h) e após imersão em SBF por 14, 21 e 28 dias.....	31
<b>Figura 6.</b> Comparação dos espectros FTIR-ATR da HA com os das camadas crescidas sobre os biovidros a base de sílica (45S5), a base de borato com 4% (BV4), 2% (BV2) ou 0% (BV0) de fosfato após 28 dias de imersão em SBF.....	32
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico de calvária de ratos 15 dias após enxerto com biovidro a base de sílica (45S5), ou de borato com 4% de fosfato (BV4), ou borato com 2% de fosfato (BV2) ou de borato sem fosfato (BV0).....	36
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico de calvária de ratos 45 dias (A, B e C) e 60 dias (D, E e F) após enxerto com biovidro a base de sílica (45S5) ou de borato com 4% (BV4), ou 2% (BV2) ou 0% (BV0) de fosfato.....	37
<b>Figura 9.</b> Escores representativos da presença de grânulos em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos após enxerto com biovidro a base de sílica (45S5), de borato com 4% de fosfato (BV4), borato com 2% de fosfato (BV2) e de borato sem fosfato (BV0).....	38
<b>Figura 10.</b> Frequência relativa dos tipos de formações ósseas.....	39

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. OBJETIVO .....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	13
3.1 Tecido Ósseo .....	13
3.1.1 Osteogênese .....	15
3.2 Biomateriais .....	16
3.2.1 Substitutos ósseos .....	18
3.3 Defeito ósseo de tamanho crítico .....	19
3.4 Absorção de infravermelho via transformada de Fourier (FTIR) .....	20
3.5 Biovidros .....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1 Obtenção dos grânulos do biovidro .....	24
4.2 Análise <i>in vitro</i> .....	25
4.3 Experimentação animal .....	27
4.3.1 Procedimento cirúrgico .....	27
4.3.2 Acompanhamento pós-cirúrgico e coleta .....	28
4.4 Estudo em microscopia óptica .....	28
4.5 Avaliação da relação entre composição química e decomposição/reabsorção dos materiais .....	28
4.6 Avaliação da relação entre composição química dos grânulos e tipos de formação óssea .....	29
5. RESULTADOS .....	30
5.1 Análise <i>in vitro</i> .....	30
5.1.1 Antes da imersão em SBF .....	30
5.1.2 Após imersão em SBF .....	32
5.2 Avaliação clínica dos animais .....	36
5.3 Análise histológica .....	36
5.3.1 Análise de 15 dias .....	36
5.3.2 Análise de 45 dias .....	36
5.3.3 Análise de 60 dias.....	37
5.4 Avaliação da relação entre composição química e decomposição/reabsorção dos materiais .....	40
5.5 Avaliação da relação entre composição química dos grânuloasetipos de formação óssea .....	40
6. DISCUSSÃO .....	41
7. CONCLUSÃO .....	46
8. REFERÊNCIAS .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

Os biovidros são materiais bioativos amplamente utilizados com finalidade ortopédica e odontológica (Krishnan e Lakshmi, 2013). O primeiro vidro bioativo foi produzido por Larry Hench (1969), e ficou conhecido como 45S5BioGlass®. É composto por óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ , 45%), óxido de sódio ( $\text{Na}_2\text{O}$ , 24,5%), óxido de cálcio ( $\text{CaO}$ , 24,5%) associado a pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ , 6%) (Hench *et al.*, 1971).

Estudos *in vitro* mostraram que, quando o biovidro é imerso em fluido corporal simulado (SBF), ocorrem trocas iônicas entre a superfície do material e o meio, resultando na formação de uma camada de apatita na superfície do biomaterial (Mačković *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2017). Este processo fornece um ambiente favorável para a adesão e proliferação de células osteoprogenitoras sendo responsável pela adesão do biovidro ao osso do hospedeiro (Hench *et al.*, 1971; Ajita *et al.*, 2015; Jones, 2015).

Os biovidros têm despertado grande interesse devido à versatilidade de suas propriedades (Lee *et al.*, 2014). Sabe-se que sua bioatividade está diretamente relacionada à sua composição química (Hench, 2013) e, por isso, são propostas mudanças nos seus componentes como, por exemplo, a substituição da base de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) por uma base de borato ( $\text{B}_2\text{O}_3$ ) (Ning *et al.*, 2007). Tais mudanças interferem em propriedades como a taxa de reabsorção, e também na qualidade do osso formado (Doostmohammadi *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2016).

A degradação dos biovidros a base de sílica é lenta e representa um desafio (Liu *et al.*, 2010). Por sua vez, os biovidros a base de borato degradam rápida e completamente em apatita, quando comparados aos de sílica (Huang *et al.*, 2006). Além disso, tem potencial osteoindutor, são resistentes e, portanto, representam um biomaterial promissor para o reparo ósseo (Zhang *et al.*, 2015). Alterações na sua composição resultam em diferenças nos processos de degradação, liberação iônica e interação celular (Yang *et al.*, 2015; Mohini *et al.*, 2015).

O fósforo, na forma de pentóxido de fósforo, é uma das matérias primas para a elaboração dos biovidros (Hench, 2006). Na composição do biovidro figura como fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Elgayar *et al.*, 2005). Quando adicionado ao biovidro, o fosfato pode aumentar a conectividade da rede formada pelos átomos de sílica ou borato e os oxigênios aos quais se ligam, o que pode diminuir a bioatividade do material (Jones, 2015). No entanto, a sua importância e o seu papel no desempenho do biovidro ainda é

controverso. Enquanto há autores que afirmam que a presença de fosfato no biovidro favorece a formação de apatita, sendo, um fator mais importante que a conectividade da rede (O'Donnel *et al.*, 2009; Mneimme *et al.*, 2011), há outros que observaram a formação e mineralização de matriz óssea mesmo na ausência deste ânion (Fujibayashi *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2007).

Tendo em vista que a literatura relata que biovidros a base de borato podem ter seus elementos dosados com o intuito de aprimorar suas propriedades biológicas e que o papel do fosfato neste processo ainda não está completamente esclarecido, a hipótese desse estudo é que variações na concentração de fosfato no biovidro geram respostas diferentes no processo de regeneração óssea.

## 2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro*, através da espectroscopia infravermelho via transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR*), as alterações físico químicas da superfície do biovidro a base de borato com diferentes concentrações de fosfato na sua composição química e avaliar, *in vivo*, o processo de regeneração óssea de defeitos de tamanho crítico (DTC) na calvária de ratos, após o enxerto com os materiais.

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar as alterações que ocorrem na superfície do biovidro após imersão em solução de fluido corporal simulado (*Simulated Body Fluid - SBF*).
- b) Analisar em microscopia de luz e descrever a histologia do sítio de regeneração dos defeitos ósseos, em cortes corados com (a) hematoxilina e eosina (H&E) e (b) tricrômico de Mallory (Azan).
- c) Fazer uma associação entre a composição química dos materiais e a sua decomposição/reabsorção, ao longo dos períodos de observação;
- d) Fazer uma associação entre a composição química dos materiais e a formação de osso novo, ao longo dos períodos de observação;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Tecido Ósseo

O osso é um tipo rígido de tecido conjuntivo que possui capacidade de se remodelar constantemente sem deixar cicatriz (Titorencu *et al.*, 2014). Dentre suas principais funções estão: suporte esquelético para o corpo, permitindo movimentos e servindo como um sistema de alavancas para as ações musculares; e proteção de órgãos e estruturas vitais, incluindo o cérebro e a medula espinhal. Os ossos também favorecem a manutenção da homeostase mineral e do equilíbrio ácido-base, além de fornecerem um ambiente para a hematopoiese que ocorre dentro dos espaços medulares (Harada e Rodan, 2003).

Assim como em todos os tecidos conjuntivos, o osso é constituído por uma matriz e diversos tipos de células importantes nos processos de síntese e de remodelação. A matriz óssea possui componentes orgânicos e inorgânicos. A parte orgânica consiste predominantemente de fibras de colágeno tipo I (aproximadamente 90% dos componentes orgânicos) e uma matriz de proteoglicanos e proteínas não colagênicas, como a osteocalcina, osteopontina, osteonectina e sialoproteínas ósseas. Já a parte inorgânica é caracterizada em sua maior parte por íons de cálcio e fósforo. É a associação entre as fibras colágenas e os componentes inorgânicos que conferem ao tecido ósseo a resistência e rigidez que necessita para desempenhar suas funções (Junqueira e Carneiro, 2013; Titorencu *et al.*, 2014).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação óssea e derivam de células mesenquimais indiferenciadas. O processo de diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos requer a expressão de genes específicos e a síntese de proteína morfogenética óssea (BMP) (Harada e Rodan, 2003; dos Santos *et al.*, 2005). Estas células apresentam formato cubóide, se dispõem lado a lado na superfície óssea e secretam a parte orgânica da matriz, além de participar da sua mineralização, pois são capazes de concentrar fosfato de cálcio. Por serem células secretoras de proteínas, apresentam Retículo Endoplasmático Rugoso e Complexo de Golgi em abundância. A matriz é depositada ao redor da célula, aprisionando-a em espaços denominados lacunas. Ao serem aprisionados na matriz, os osteoblastos se diferenciam e passam a ser chamados de osteócitos (Aubin *et al.*, 1995; Junqueira e Carneiro, 2013; Andrade *et al.*, 2007; Florencio-Silva *et al.*, 2015).

Os osteócitos correspondem aos osteoblastos que ficaram aprisionados nas lacunas. Entretanto, antes que isto ocorra, o osteoblasto emite projeções citoplasmáticas ao redor das quais haverá deposição de matriz, formando os canaliculos. O processo de diferenciação de um osteoblasto em osteócito inclui, também, alterações morfológicas, tais como diminuição de organelas, incluindo o Reticulo Endoplasmático Rugoso, o Complexo de Golgi se torna pouco desenvolvido, além do aumento da relação núcleo-citoplasma. Os osteócitos se comunicam através de seus prolongamentos que passam dentro dos canaliculos, podendo trocar íons e pequenas moléculas, como as prostaglandinas. O espaço entre o prolongamento citoplasmático e a parede interna do canaliculo é preenchido por fluido tecidual que também contribui para a troca de substâncias entre as células. Apesar de exercer pouca atividade de síntese, os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz, pois transportam íons cálcio através dos canaliculos até os osteoblastos. Além disso, possuem importante função de mecanosensores, pois a rede de canaliculos e lacunas promove uma ampla área de contato entre as células e a parte não celular do osso, tendo, portanto, a capacidade de detectar pressões e cargas, e transformar esse estímulo mecânico em sinais bioquímicos, regulando, assim, a atividade dos osteoblastos e osteoclastos e, conseqüentemente, o processo de remodelação óssea (Kartsogiannis e Ng, 2004; Andrade *et al.*, 2007; Junqueira e Carneiro, 2013; Florencio-Silva *et al.*, 2015).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas, e ramificadas, que derivam da célula tronco hematopoiética e se localizam em depressões na superfície óssea denominadas de Lacunas de Howship. São responsáveis pela reabsorção óssea, através da secreção de ácidos e enzimas, e sua atividade é regulada por citocinas, pela calcitonina e pelo paratormônio (Kartsogiannis e Ng, 2004; Andrade *et al.*, 2007; Junqueira e Carneiro, 2013; Florencio-Silva *et al.*, 2015). O desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea pode resultar em processos patológicos como a osteoporose e a osteopetrose (Titorencu *et al.*, 2014; Florencio-Silva *et al.*, 2015).

A nível macroscópico, o osso pode ser classificado em esponjoso, caracterizado por grandes espaços (espaços medulares) rodeados por finas placas ósseas (trabéculas) que se anastomosam, ou compacto, que se caracteriza por ser uma estrutura mais densa e sem espaços visíveis (Gartner e Hiatt, 2002).

Microscopicamente, o tecido ósseo pode ser classificado como imaturo ou maduro. O tecido ósseo imaturo, também denominado de primário ou não lamelar, se caracteriza pela disposição irregular das fibras colágenas. Este tecido é substituído pelo

osso maduro, permanecendo apenas em locais onde há constante remodelação óssea (próximo às suturas, alvéolos dentários e alguns pontos de inserção de tendões). O tecido ósseo maduro, por sua vez, é caracterizado por uma disposição paralela das fibras colágenas que formam camadas, denominadas de lamelas, podendo, por isso, também ser chamado de tecido ósseo lamelar. As lamelas podem ser paralelas entre si ou formar círculos concêntricos ao redor de um canal pelo qual passam vasos e nervos, o canal de Havers. Cada canal de Havers em conjunto com as lamelas que o circundam forma uma estrutura cilíndrica que percorre longitudinalmente o osso e é conhecida como Sistema de Havers ou ósteon. Conectando os canais de Havers entre si e com as superfícies interna e externa do osso, encontram-se os canais de Volkmann (Gartner e Hiatt, 2002, Junqueira e Carneiro, 2013).

O osso é revestido externa e internamente por membranas conjuntivas, o perióstio e o endóstio, respectivamente. A primeira é formada por duas camadas, sendo uma mais interna (em contato com a superfície óssea) rica em células osteoprogenitoras e a outra mais externa e se caracteriza pela grande quantidade de fibras colágenas e fibroblastos. Esta membrana se adere ao osso através das fibras de Sharpey. O endóstio é constituído por uma camada contínua de células osteoprogenitoras e reveste os espaços do osso esponjoso, a cavidade medular e os canais de Havers (Gartner e Hiatt, 2002, Junqueira e Carneiro, 2013).

### 3.1.1 Osteogênese

Existem dois tipos de ossificação: a intramembranosa e a endocondral. A ossificação intramembranosa refere-se à formação óssea que acontece em uma membrana mesenquimal, na qual as células mesenquimais se diferenciam em células osteoprogenitoras e, a seguir, em osteoblastos. Os osteoblastos secretam a matriz orgânica, denominada osteóide, que se mineraliza, aprisionando-os na forma de osteócitos. Este processo é o responsável pelo desenvolvimento dos ossos chatos do crânio, maxilares e ossos curtos, além do crescimento em espessura dos ossos longos. A parte da membrana que não sofre ossificação forma o endóstio e o perióstio (Gartner e Hiatt, 2002; Junqueira e Carneiro, 2013).

A ossificação endocondral ocorre em um molde de cartilagem hialina. Este é o processo responsável pelo crescimento dos ossos longos. Inicialmente, ocorre hipertrofia dos condrócitos, fazendo com que a matriz cartilaginosa seja reduzida a trabéculas muito finas que, a seguir, se mineralizam levando à apoptose dos

condrócitos. Os espaços deixados por essas células são, então, invadidos por vasos sanguíneos e células osteoprogenitoras, que se diferenciarão em osteoblastos e depositarão matriz óssea sobre a matriz cartilaginosa. Dessa forma, a cartilagem hialina vai sendo gradativamente substituída por osso (Gartner e Hiatt, 2002, Junqueira e Carneiro, 2013).

A formação de matriz óssea ocorre em duas etapas. A primeira etapa consiste na formação da matriz orgânica através da secreção de colágeno tipo I, proteoglicanos e proteínas não colagênicas. A segunda etapa é a mineralização da matriz. Para que esta etapa ocorra, corpos arredondados envolvidos por uma membrana, que se originam na membrana plasmática dos osteoblastos, são liberadas para a matriz óssea. Estas estruturas recebem o nome de vesículas da matriz e funcionam como microcompartimentos nos quais os íons cálcio e os íons fosfato se unem ocorrendo, assim a deposição de cristais de hidroxiapatita (Golub, 2009).

A regeneração óssea ocorre em três etapas distintas, mas que se sobrepõem: inflamação, reparo e remodelação. Na primeira fase, células inflamatórias e fibroblastos invadem o local da lesão, resultando na formação de tecido de granulação, crescimento vascular e migração de células mesenquimais. Na fase de reparo, os fibroblastos começam a formar uma estrutura que auxilia na vascularização. À medida que a vascularização progride, o osteóide é secretado e mineralizado, formando um calo ósseo em torno do local de reparação. Finalmente, ocorre a deposição de osso lamelar e a remodelação através da qual o osso adquire suas características originais (Kalfas, 2001).

### 3.2 Biomateriais

A Sociedade Europeia de Biomateriais, em 1987, definiu biomaterial como “qualquer substância ou combinação de substâncias, que não sejam drogas, de origem animal ou sintética que podem ser usadas por um período de tempo, como parte ou como um todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo” (Weinand, 2009; Salgado *et al.*, 2011).

Na Odontologia, os biomateriais podem ser utilizados para diversas finalidades, incluindo restaurações (Deb e Chana, 2015), preservação (Araújo e Lindhe, 2009; Borg e Mealey, 2015) ou reconstrução alveolar (Maiorana *et al.*, 2016; Sabet *et al.*, 2017), preenchimento de defeitos ósseos peri-implantares (Bassi *et al.*, 2015) e levantamento de seio maxilar (Bortoluzzi *et al.*, 2014).

Os biomateriais são utilizados há mais de 2000 anos para o tratamento de tecidos doentes. A princípio, devido ao desconhecimento do conceito de biocompatibilidade, utilizava-se qualquer material disponível. Dessa forma, até os anos 60' houve uma alta taxa de insucesso dos tratamentos utilizando estes materiais, pois muitos eram tóxicos e/ou patogênicos (Weinand, 2009).

Somente durante as décadas de 1960 e 1970, foram desenvolvidos os primeiros materiais próprios para utilização em corpo humano, dando início a primeira geração de biomateriais. Acreditava-se que estes materiais deveriam ter propriedades físicas semelhantes às do tecido que estavam substituindo com o mínimo de resposta imune, dessa forma, era desejável que fossem o mais quimicamente inertes possível. Nesta categoria encontram-se os metais, como os aços inoxidáveis. Entretanto, microscopicamente, observou-se a formação de um tecido fibroso ao redor do material. Muitos estudiosos acreditam que este tecido se desenvolve devido a uma reação entre o metal e o hospedeiro, demonstrando que estes metais não eram completamente inertes. Embora não fossem tóxicos e, portanto, não apresentassem resposta inflamatória ou carcinogênica, estes materiais apresentavam rejeição em micro escala (Hench *et al.*, 1971; Hench e Polak, 2002).

A partir da década de 80, percebeu-se que o osso poderia se unir diretamente aos materiais à base de apatita, promovendo a cicatrização óssea. A segunda geração de biomateriais foi, então, representada por materiais que deveriam desencadear uma reação controlada em meio fisiológico, de modo que o objetivo passou a ser a bioatividade. Nesta categoria estão materiais como os vidros, as cerâmicas, as vitrocerâmicas e a hidroxiapatita sintética. Em seguida o foco passou a ser a utilização de materiais reabsorvíveis, como, por exemplo, o tricálcio fosfato (TCP), ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA). Estes materiais apresentam reabsorção controlada quimicamente, de modo que são substituídos gradativamente pelo tecido do hospedeiro (Hench e Polak, 2002).

Já os biomateriais da terceira geração são desenvolvidos com o objetivo de gerar respostas teciduais a níveis moleculares, são os materiais biomiméticos. Além disso, os conceitos de bioatividade e reabsorção se fundem, ou seja, os materiais devem ser tanto reabsorvíveis quanto bioativos (Hench e Polak, 2002; Pires *et al.*, 2015).

### 3.2.1 Substitutos ósseos

Defeitos ósseos extensos ocasionados por traumas, ressecção de tumores, infecções ou anormalidades congênitas representam um importante desafio clínico (Szpalski *et al.*, 2010). O enxerto ósseo autógeno é considerado o padrão-ouro para a resolução destes casos. Entretanto a sua utilização apresenta algumas desvantagens, como por exemplo a quantidade limitada de osso disponível e o aumento da morbidade do paciente devido a necessidade de um segundo sítio cirúrgico (Giannoudis *et al.*, 2005). Dessa forma, fica evidente a necessidade da utilização de biomateriais.

Os biomateriais utilizados como substitutos ósseos podem ser osteocondutores e/ou osteoindutores. Os materiais osteocondutores são aqueles que servem de arcabouço para o crescimento ósseo e dependem, portanto, da ação de células diferenciadas. Já a osteoindução refere-se a capacidade de um agente de estimular a diferenciação de células indiferenciadas em pré-osteoblastos (Albrektsson e Johansson, 2001).

Idealmente, um biomaterial deve ser biocompatível, bioativo e bioreabsorvível, além de possuir propriedades mecânicas adequadas à função que irá desempenhar e ao tecido com o qual interage, e ser resistente à corrosão (Weinand, 2009; Pires *et al.*, 2015). Além disso, é importante que a reabsorção ocorra de forma proporcional ao metabolismo ósseo, o que é muito difícil de ser alcançado (Cerruti, 2004).

Os biomateriais utilizados atualmente podem ser constituídos por metais, cerâmicas, polímeros e materiais de origem natural. Os metais, especialmente o aço inoxidável, liga de cobalto-cromo e titânio, destacam-se pelas suas características mecânicas e, por isso, são os mais utilizados como implantes que receberão altas cargas. Os polímeros, por sua vez, podem ser utilizados como componentes cardíacos, próteses faciais, confecção de próteses dentárias, dentre outros. Os materiais de origem natural são aqueles obtidos a partir de animais ou plantas e possuem como principal vantagem sua similaridade com os componentes do corpo humano (Pires *et al.*, 2015).

As cerâmicas apresentam como principal desvantagem uma baixa resistência a fratura, mas são altamente compatíveis com o meio fisiológico, além de serem resistentes ao desgaste, sendo, portanto, utilizadas para reparo e aumento ósseo. Elas podem ser bioinertes (por exemplo, a zircônia), bioativas (como a hidroxiapatita sintética, os biovidros e as vitrocerâmicas) ou bioreabsorvíveis (por exemplo, o  $\beta$  – tricálcico fosfato ou  $\beta$ -TCP) (Pires *et al.*, 2015). Tanto a hidroxiapatita quanto o  $\beta$ -TCP são denominadas cerâmicas de fosfato de cálcio e têm sido muito utilizadas para reparos ósseos pois sua composição é semelhante aos principais componentes inorgânicos da

matriz óssea (cálcio e fósforo), o que favorece a integração óssea além de evitar a rejeição do implante (Poh *et al.*, 2015). Desde os anos 90, a hidroxiapatita se tornou amplamente utilizada em reparos ósseos, devido ao seu potencial de osteocondução, entretanto a sua degradação é muito lenta podendo demorar até 5 anos para ocorrer. Em contrapartida, o  $\beta$ -TCP possui uma reabsorção muito rápida, o que também representa uma desvantagem. Dessa forma, estes materiais têm sido associados na forma de fosfato de cálcio bifásico (BCP) melhorando, assim, a taxa de degradação e a formação óssea (Lakhkar *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2014; Pires *et al.*, 2015)

### 3.3 Defeito ósseo de tamanho crítico

Vários modelos *in vivo* são utilizados para avaliar o processo de regeneração óssea (Gomes e Fernandes, 2011). Um Defeito de Tamanho Crítico (DTC) é compreendido como o menor tamanho de defeito ósseo que não se regenera completa e espontaneamente durante o ciclo de vida do animal, ficando, então, preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Schmitz e Hollinger, 1986). Para pesquisa em animais, o DTC é considerado como aquele que não cicatriza espontaneamente durante o período de estudo (Gosain *et al.*, 2000). O DTC é um dos modelos mais utilizados para avaliar o processo de regeneração óssea, mas apresenta como principal desvantagem a dificuldade na padronização da sua dimensão (Vajgel *et al.*, 2013).

A realização de defeitos em calvária é uma abordagem muito utilizada entre pesquisadores, pois nesta região a regeneração pode ser avaliada tanto radiograficamente quanto por técnicas histológicas. Além disso, a dura máter e a pele ajudam a estabilizar o material e é possível realizar um defeito de tamanho adequado (Gomes e Fernandes, 2011). O tamanho do defeito varia de acordo com a espécie e a idade dos animais utilizados. De um modo geral, um defeito de 8mm de diâmetro é considerado um tamanho apropriado para ratos adultos (Schmitz e Hollinger, 1986; Fernandes *et al.*, 2009; Spicer *et al.*, 2012).

### 3.4 Absorção de infravermelho via transformada de Fourier (FTIR)

A região do infravermelho (IV) do espectro eletromagnético corresponde à região situada entre a região visível e a região de microondas. A maioria dos compostos que possuem ligações covalentes, absorvem várias frequências de radiação da região de infravermelho. A passagem dessa radiação através da amostra é convertida em energia vibracional. Através das vibrações dos átomos de uma molécula, é possível obter

informações sobre os tipos de ligações entre eles. As vibrações podem ser de estiramento ou de deformações angulares. As vibrações de estiramento são variações contínuas na distância entre dois átomos e podem ser simétricas ou assimétricas. Já as vibrações de dobramento ou deformação angular podem ser simétricas (balanço no plano e sacudida fora do plano) ou assimétricas (torção fora do plano e tesoura no plano). Essas vibrações aparecem no espectro na forma de bandas, de modo que, essa técnica funciona como uma espécie de quebra cabeças, possibilitando a caracterização dos materiais (Medeiros, 2009; Leite e Prado, 2012). Uma unidade muito utilizada na espectroscopia é o número de onda, que corresponde ao inverso do comprimento de onda, sendo, portanto diretamente proporcional a frequência e a energia da radiação (Leite e Prado, 2012).

Dentre as técnicas de espectroscopia infravermelho, uma das mais utilizadas atualmente é a Transformada de Fourier Infravermelho (FTIR) devido a sua alta sensibilidade e resolução, além de ser uma técnica rápida (Leite, 2008). Os aparelhos de FTIR se baseiam no Interferômetro de Michelson. Uma fonte emite um feixe de radiação infravermelho que é separado através de um *beamsplitter*, de modo que uma parte vai para um espelho móvel enquanto a outra vai para um espelho fixo. Após refletir nos espelhos, esses feixes se encontram e sofrem interferência, pois devido a movimentação do espelho móvel, esses feixes percorreram distâncias diferentes. Esses dois feixes combinados são focados para a amostra, na qual as frequências específicas de energia são absorvidas, e, em seguida, para o detector, no qual é feita a medição final. O interferograma obtido, que está no domínio do tempo é, então, convertido pra o domínio da frequência através da transformada de Fourier (Leite, 2008; Medeiros, 2009, Aliske, 2010).

A utilização da técnica da Reflexão Total Atenuada (ATR) consiste em colocar a amostra em contato com um cristal altamente denso e com alto índice de refração. O feixe de infravermelho passa através do cristal e penetra uma camada fina da amostra. A energia é atenuada devido às várias reflexões que sofrem ao longo da amostra e a amostra pode ser utilizada para outras análises. As mudanças que ocorrem no feixe infravermelho são medidas com o uso de um acessório de reflexão atenuada (Aliske, 2010).

### 3.5 Biovidros

O primeiro vidro bioativo foi produzido em 1969, na Universidade da Flórida, pelo professor Larry Hench, que objetivava desenvolver um material que fosse capaz de substituir tecidos ósseos sem que houvesse rejeição e/ou formação de membrana cicatricial. Este material era composto por 45% de SiO<sub>2</sub>, 24,5% de Na<sub>2</sub>O, 24,5% de CaO, associado a 6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e ficou conhecido 45S5BioGlass® (Hench *et al.*, 1971), para representar a concentração de sílica (45S) e a proporção entre o cálcio e o fósforo (Ca/P =5) (Hench *et al.*, 1971; Hench, 2013).

Este vidro consiste em tetraedros de sílica (SiO<sub>4</sub>) interconectados pelos oxigênios que se ligam a duas sílicas (Si-O-Si), denominados de “oxigênios de ponte” (BO). A sílica é, portanto, o átomo de formação da rede. Quanto maior a concentração de sílica, maior a conectividade da rede e menor sua bioatividade. O sódio e o cálcio, por sua vez, vão agir como modificadores de rede, pois quebram as ligações Si-O-Si, transformando, assim, os átomos de “oxigênio de ponte” em íons de “oxigênio de não ponte” (NBO), o que diminui a conectividade da rede (Jones, 2015).

Um estudo em ratos realizado por Ted Greenlee demonstrou que, após seis semanas, o biovidro se ligou tão fortemente ao osso que não poderia ser removido (Hench *et al.*, 1971). Esta adesão entre o biovidro e o osso do hospedeiro ocorre devido à formação de uma camada de hidroxiapatita na superfície do biomaterial que fornece um ambiente favorável para a adesão e proliferação de células osteoprogenitoras (Hench *et al.*, 1971; Ajita *et al.*, 2015; Jones, 2015).

Estudos *in vitro* demonstraram que o processo de formação da camada de hidroxiapatita se inicia com reações na superfície que envolvem trocas iônicas com a liberação de íons Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> da superfície do biovidro e incorporação de íons H<sup>+</sup> ou H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> presentes na solução, levando à formação de grupos silanol (Si-OH). Este processo resulta em um aumento no pH do meio. O aumento no pH acima de 9 resulta na quebra da rede de sílica pelos íons OH<sup>-</sup>, levando a um aumento dos grupos silanol na superfície do vidro. Na terceira etapa, ocorre a condensação e polimerização da camada rica em sílica formada pelo grupo silanol (Si-OH). Em seguida, íons Ca<sup>2+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> provenientes tanto do vidro quanto da solução se depositam sobre a camada rica em SiO<sub>2</sub>, levando à formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfo. A camada de fosfato de cálcio amorfo incorpora íons carbonato e de hidroxilas da solução e cristaliza, formando uma camada de *apatita* (Hench *et al.*, 1971; Hench e Polak, 2002; Rahamann *et al.*, 2011; Hench, 2013; Bingel *et al.*, 2015; Jones, 2015).

Bingel *et al.* (2015), em um estudo *in vitro*, analisaram a importância do pH para a formação da camada de apatita na superfície do vidro e concluíram que a troca iônica e, conseqüentemente, a formação da camada de apatita ocorrem em pH baixo, o que indica que este processo pode acontecer mesmo em regiões com algum grau de acidez, como nas inflamações. Estes autores observaram, também, que os íons cálcio são rapidamente dissolvidos na solução. Entretanto, como estes íons são utilizados para a formação da camada de apatita, a sua dissolução é normalmente subestimada. Skipper *et al.* (2004) observaram que em menos de 30 minutos após imersão em SBF, a maior parte do cálcio presente nas amostras de biovidro havia sido dissolvido e que de 30 minutos a 72 horas este íon foi continuamente liberado e depositado em sua superfície do biomaterial.

A liberação de íons e a formação da camada de apatita resultam em um ambiente ideal para que ocorra a colonização da superfície por células mesenquimais que irão se diferenciar em osteoblastos. Finalmente, ocorre a formação de uma matriz extracelular e sua mineralização, resultando na formação de um osso semelhante em arquitetura e propriedades biomecânicas ao osso originalmente presente naquele sítio (Hench *et al.*, 1971; Hench e Polak, 2002; Schwartz *et al.*, 2008; Rahamann *et al.*, 2011; Hench, 2013; Poh *et al.*, 2015).

A utilização de biomateriais na forma de partículas ou grânulos facilita o preenchimento dos defeitos ósseos, sendo, portanto, a mais utilizada por ortopedistas e dentistas (Jones, 2015). Um estudo realizado por Ajita *et al.* (2015), utilizando nanopartículas de um biovidro composto por SiO<sub>2</sub>, CaO e P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, demonstrou que a dissolução de íons cálcio, fosfato e sílica está relacionada ao tamanho da partícula, sendo que a liberação de fosfato foi inversamente proporcional ao tamanho da partícula de biovidro analisada. Estudos tanto em animais quanto em humanos observaram que o biovidro utilizado desta forma apresenta resultados positivos, estimulando a formação óssea (Tiomis *et al.*, 2010; Grover *et al.*, 2013; Ferrando *et al.*, 2017; Naqvi *et al.*, 2017).

O BioGlass 45S5®, desde seu desenvolvimento, tem despertado grande interesse devido a versatilidade de suas propriedades e várias formulações têm sido propostas objetivando aprimorar o processo de regeneração óssea (Lee *et al.*, 2014). Pan *et al.* (2017), em um estudo realizado em coelhos, observaram que acrescentar BMP-2 a um biovidro associado ao  $\beta$ -TCP melhora a vascularização e a regeneração óssea, com degradação do material em um tempo favorável.

Uma importante modificação consistiu na substituição da base de óxido de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) por uma base de óxido de boro ( $\text{B}_2\text{O}_3$ ) (Ning *et al.*, 2007). Assim como os biovidros a base de sílica, a degradação dos biovidros a base de borato resulta na formação de uma camada semelhante à hidroxiapatita que é responsável pela forte adesão ao osso do hospedeiro (Liu *et al.*, 2010). Entretanto, biovidros a base de borato se degradam mais rapidamente e se convertem totalmente em apatita (Brown *et al.*, 2008), favorecendo a formação óssea (Gorustovich *et al.*, 2006), enquanto nos biovidros base de sílica, aproximadamente 85% da sílica permanece na forma de sílica gel (Liu *et al.*, 2013).

A degradação do biovidro a base de borato ocorre com a quebra das ligações B-O e a liberação de íons boro e dos modificadores de rede, como o  $\text{Na}^+$ , associada à perda de massa devido à sua conversão em HAp (Brown *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010). Deliormanlı (2013), analisando biovidros a base de borato na forma de *scaffold* com filamentos de diferentes espessuras, observou que a taxa de degradação foi maior nas estruturas com filamentos mais finos. Embora concentrações de íons borato acima de 2,5mM possam ter efeitos negativos sobre as células (Brown *et al.*, 2008), estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que biovidros contendo borato são biocompatíveis e favorecem a osteogênese (Marion *et al.*, 2005; Gorustovich *et al.*, 2006; Bi *et al.*, 2012; 2013; Wang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015).

O fósforo é normalmente encontrado na superfície do biovidro na forma de ortofosfato (Elgayar *et al.*, 2005). Quando adicionado à composição do biovidro, o fosfato se liga aos cátions modificadores de rede, removendo-os da sua função e fazendo com que o oxigênio se ligue a outro átomo de sílica. Dessa forma, o aumento da concentração de fosfato na composição do biovidro leva a uma diminuição do número de NBO e aumento de BO, resultando em uma maior conectividade da rede (Tilocca e Cormack, 2007; Mercier *et al.*, 2011). Entretanto, estudos *in vitro* demonstraram que a formação de apatita ocorreu de forma mais rápida com o aumento da concentração de fosfato (O'Donnell *et al.*, 2009; Mneimme *et al.*, 2011). Manupriya *et al.*, (2007) concluíram que a presença de fosfato é essencial para que ocorra a formação de apatita. Porém, Jones *et al.* (2007), realizando estudo em cultura de células, observaram que o biovidro sem fosfato é capaz de estimular a secreção de colágeno tipo I pelos osteoblastos e a mineralização da matriz extracelular. Fujibayashi *et al.* (2003), relataram a formação de apatita e crescimento ósseo mesmo quando utilizado biovidro

sem fosfato. Sendo assim, a importância do fosfato na composição do biovidro ainda não está totalmente esclarecida.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

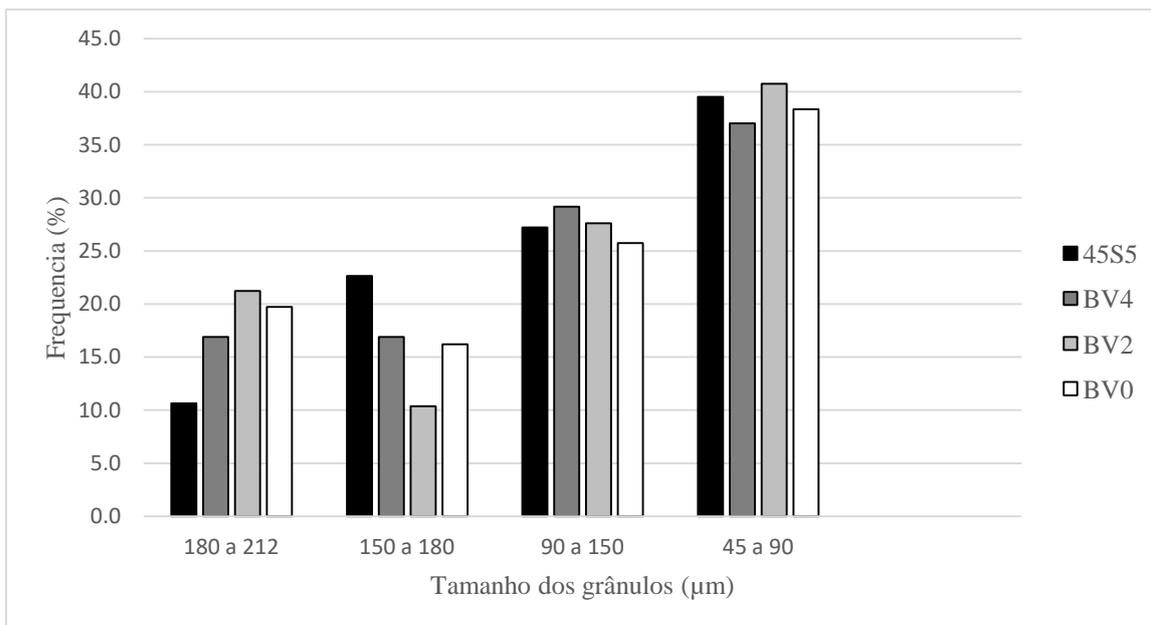
##### 4.1 Obtenção dos grânulos de biovidro

Três formulações de biovidro à base de borato e uma à base de sílica (45S5), usada como controle positivo, foram desenvolvidas e cedidas para teste, pela professora Dra Franciana Pedrochi do Departamento de Física da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os biovidros a base de borato eram compostos por 4% (BV4) ou 2% (BV2) de fosfato, ou não apresentavam fosfato em sua composição (BV0). O biovidro a base de sílica empregado no estudo possui a composição clássica descrita por Hench *et al.* (1971). A composição química dos materiais está descrita na Tabela 1.

A análise *in vitro* foi realizada pela pesquisadora Dra Francielle Sato do Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá. Para esta análise, os biovidros foram cortados em discos de aproximadamente 1 mm de espessura e 8 mm de diâmetro. Para a análise *in vivo*, as amostras foram trituradas e tamisadas, e foram obtidos grânulos cujo diâmetro variou de 45 a 210  $\mu\text{m}$ . Durante a tamisação, os grânulos retidos nas tamises foram pesados em balança de precisão (Alpax, Diadema, São Paulo, Brasil) como forma de quantificar qual foi o tamanho prevalente de granulação. Os resultados relacionados ao tamanho dos grânulos obtidos para cada biovidro estão representados na Figura 1.

**Tabela 1.** Composição química das amostras de biovidro: BV4 (base de borato com 4% de fosfato), BV2 (base de borato com 2% de fosfato), BV0 (base de borato sem fosfato) e 45S5 (base de sílica).

Biovidro	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	SiO <sub>2</sub> (%)	CaF <sub>2</sub> (%)	CaO (%)	Na <sub>2</sub> O (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)
<b>BV4</b>	60	0	5	13	18	4
<b>BV2</b>	60	0	5	14	19	2
<b>BV0</b>	60	0	5	15	20	0
<b>45S5</b>	0	45	0	24,5	24,5	6



**Figura 1.** Frequência de grânulos dos biovidros BV4 (base de borato com 4% de fosfato), BV2 (base de borato com 2% de fosfato), BV0 (base de borato sem fosfato) e 45S5 (base de sílica) de acordo com o seu tamanho ( $\mu\text{m}$ ).

#### 4.2 Análise *in vitro*

Os discos, de aproximadamente 1 mm de espessura e 8 mm de diâmetro, foram cortados ao meio. Cada uma das amostras recebeu polimento em lixas de carbetto de silício nas gramaturas de 400 e 600, respectivamente. Então foram limpas em ultrassom com acetona por 30 minutos.

Os estudos de bioatividade *in vitro* foram feitos por meio da imersão das amostras em solução de fluido corporal simulado (SBF), preparada de acordo com Kokubo e Takadama (2006). O processo de imersão foi realizado em tubos plásticos de fundo cônico (tipo falcon), mantendo a razão da área superficial da amostra em relação ao volume de SBF igual a  $0,1 \text{ cm}^{-1}$  (Kokubo e Takadama, 2006), sem que o biovidro mantivesse contato com as paredes ou o fundo do tubo. O tubo selado foi colocado em um banho térmico, mantido a  $37^{\circ}\text{C}$ . Ao término de cada período de imersão, que compreendeu os intervalos de tempo de 14, 21 e 28 dias, as amostras foram retiradas do contato com o fluido e enxaguadas com água deionizada (Kavitha *et al.*, 2014). Em seguida, reservadas em estufa com temperatura regulada em  $50^{\circ}\text{C}$  para posterior caracterização das mudanças ocorridas em sua superfície. O Quadro 1 lista os reagentes e suas quantidades utilizados na preparação de 1 litro de SBF.

As medidas de absorção de infravermelho via transformada de Fourier (FTIR) foram feitas em um espectrômetro (VERTEX 70v, BRUKER) equipado com acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR). O espectro de cada amostra representa a média de 128 varreduras de  $4\text{ cm}^{-1}$  de resolução espectral, no intervalo entre 400 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Entretanto, os resultados apresentam a região de interesse, entre 400 a  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Foram realizadas medidas nas amostras, antes e após cada período de imersão em SBF.

Os espectros obtidos após os 28 dias de imersão foram comparados ao espectro da análise de uma hidroxiapatita pura obtida a partir de peixe pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), cedido pelo Núcleo de Pesquisas em Limnologia Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA - UEM), como previamente descrito por Bonadio *et al.* (2017).

Cloreto de sódio (NaCl)  
 Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)  
 Cloreto de potássio (KCl)  
 Fosfato de potássio bibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O)  
 Cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)  
 Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>)  
 Sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
 Trisaminometano (TRIS) ((HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>)  
 Ácido clorídrico (HCL)

**Quadro 1.** Reagentes utilizados na preparação do SBF (fluido corporal simulado), segundo Kokubo e Takadama (2006).

#### 4.3 Experimentação animal

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (protocolo nº 4282010716).

##### 4.3.1 Procedimento cirúrgico

Foram utilizados 96 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*) adultos, com idade mínima de 70 dias, com peso corporal entre 250 e 300g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá, em um ambiente ideal com temperatura de 20°C, ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas com ração e água *ad libitum* por um período de ambientação de 7 dias, após o qual foi realizada a cirurgia.

Após anestesia intramuscular, utilizando uma associação de cloridrato de xilazina 2% (20mg/Kg de peso do animal) (Anasedan®, Ceva,Paulínia, São Paulo, Brasil) e cetamina 10% (100mg/ Kg de peso do animal) (Dopalen®, Ceva,Paulínia, São Paulo, Brasil) na proporção de 1:1, foi feita a epilação manual da região da cabeça, seguida por anti-sepsia com iodo tópico. A seguir foi realizada uma incisão na região da calota craniana, se estendendo da base de uma orelha a outra, transcorrendo transversalmente a calota e se aprofundando até o periósteo.

Objetivando a exposição óssea, os tecidos foram, então, descolados com a utilização de uma descolador de Molt 2/4 (Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil). Um defeito ósseo foi produzido na calvária, cefalicamente à incisão da pele, utilizando uma broca trefina (Neodent®, Curitiba, PR, Brasil) de 8mm, montada em contra-ângulo Impulsion® (Anthogyr,São Bernardo do Campo, SP, Brasil), acoplada a um motor cirúrgico BLM 600 Baby® (Driller, Carapicuíba,SP, Brasil) com rotação de 816r.p.m. e irrigação abundante com solução fisiológica estéril.

Os animais foram divididos de forma randomizada em quatro grupos de acordo com o material enxertado, totalizando 24 animais por grupo. Após preenchimento do defeito com os grânulos (Figura 2), o retalho foi suturado com pontos simples utilizando fio de Seda 4-0 Ethicon® (Johnson, Nova Jersey, EUA) e, como medida anti-séptica local, solução alcoólica de polivinilpirrolidona iodada foi aplicada topicamente na região.



**Figura 2.** Procedimento cirúrgico para colocação dos enxertos de biovidro a base de sílica (45S5), borato com 4% de fosfato (BV4), borato com 2% de fosfato (BV2) ou borato sem fosfato (BV0). Em A, exposição da dura mater após realização do defeito com broca trefina com 8mm de diâmetro. Em B, o defeito está completamente preenchido com os grânulos do material.

#### 4.3.2 Acompanhamento pós-cirúrgico e coleta

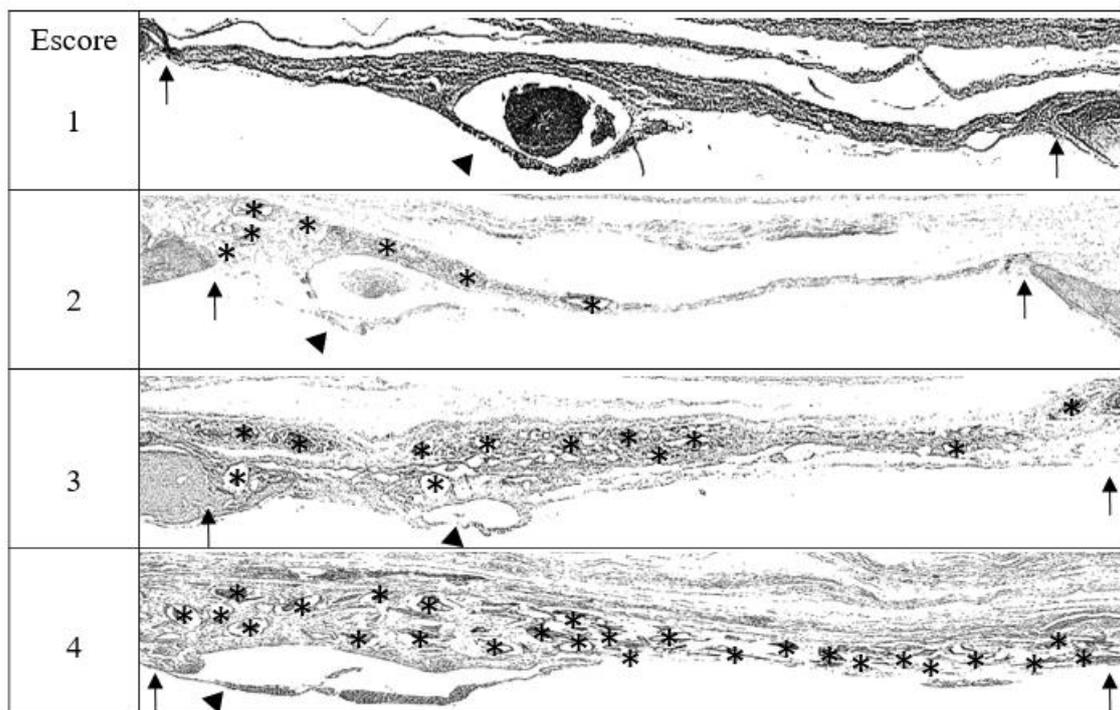
Após a etapa cirúrgica, os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá, nas mesmas condições do período de ambientação, e observados durante todo o período do experimento, a fim de que qualquer alteração na região da cirurgia pudesse ser diagnosticada e tratada. A eutanásia foi realizada aos 15, 45 e 60 dias após o enxerto (n=8/grupo/período) por meio de injeção de lidocaína (10 mg/kg) seguida de aplicação de solução de 120mg/kg de tiopental. A calvária foi coletada e fixada em paraformaldeído 4% para estudo histológico.

#### 4.4 Estudo em microscopia óptica

Após a fixação as amostras foram descalcificadas em solução de Morse (ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20%) por 15 dias. A seguir, cada amostra foi dividida ao meio para o processamento histológico de inclusão em parafina. Cortes seriados de 7µm foram corados com (a) hematoxilina e eosina (H&E) e (b) Azan. A coloração em Azan permite diferenciar o tecido ósseo não mineralizado, ou osteóide (cora em azul) daquele mineralizado (cora em vermelho).

#### 4.5 Avaliação da relação entre composição química e decomposição/reabsorção dos materiais.

Para a análise da presença de grânulos, foram observados, em média, 15 cortes histológicos por animal (em lâminas coradas com H&E e Azan) em 8 animais/ grupo, totalizando 120 cortes/grupo. Considerando que a quantidade e distribuição de grânulos no defeito foi bastante característica, foram atribuídos escores de classificação: (1) ausência total; (2) pequena quantidade de grânulos restrita às margens do defeito; (3) quantidade moderada de grânulos; (4) grande quantidade de grânulos ocupando toda a extensão do defeito. O Quadro 2 ilustra esta classificação, representada por meio de imagens de cortes histológicos convertidos em ilustrações. Para cada tempo avaliado, foi calculada a média dos escores e o desvio padrão.



**Quadro 2.** Esquema ilustrativo da presença de grânulos em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos após enxerto com biovidro a base de sílica (45S5), de borato com 4% de fosfato (BV4), borato com 2% de fosfato (BV2) e de borato sem fosfato (BV0). As imagens foram classificadas, de acordo com a presença dos grânulos, em: (a) Ausência de grânulos (escore 1) (b) Poucos grânulos restritos à margem e/ou ao entorno do seio sagital (cabeça de seta) (escore 2); (c) Quantidade moderada de grânulos (escore 3); (d) Muitos grânulos (escore 4). \* indica os grânulos; Setas indicam margens do defeito.

#### 4.6 Avaliação da relação entre composição química dos grânulos e tipos de formação óssea.

Para realizar esta análise, as formações ósseas mais frequentes encontradas (exceto o osso formado a partir da margem do defeito), foram classificadas de acordo com sua morfologia e localização, em: Tipo A: tecido ósseo primário não lamelar, irregular, localizado no defeito propriamente dito ou no perióstio adjacente ao defeito; Tipo B: ilhotas ósseas formadas pela deposição lamelar de matriz, localizadas na dura máter, de formação arredondada ou oval, circundadas por osteoblastos; Tipo C: depósitos de matriz localizados em áreas ocupadas anteriormente pelos grânulos de biomaterial (Figura 3). Para cada animal, foram consideradas as formações ósseas que apareceram em pelo menos um dos quinze cortes avaliados.



**Figura 3.** Fotomicrografias representativas dos diferentes tipos de formações ósseas observadas no sítio de regeneração, em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos após enxerto com biovidro a base de sílica (45S5), de borato com 4% de fosfato (BV4), borato com 2% de fosfato (BV2) e de borato sem fosfato (BV0). Em (A), formação do tipo A, caracterizada por um tecido ósseo primário (bt) não lamelar, irregular, localizado no defeito propriamente dito ou no periósteo adjacente ao defeito. Em (B), formação do tipo B: ilhotas ósseas (bi) formadas pela deposição lamelar de matriz, localizadas na dura máter, de formação arredondada ou oval, circundadas por osteoblastos. Em (C), formação do tipo C: depósitos de matriz (nb) localizados em áreas ocupadas anteriormente pelos grânulos de biomaterial. . Aumento original: 10x (B), 40x (A e C). Coloração: (A) Azan; (B e C) H&E. ct: tecido conjuntivo.

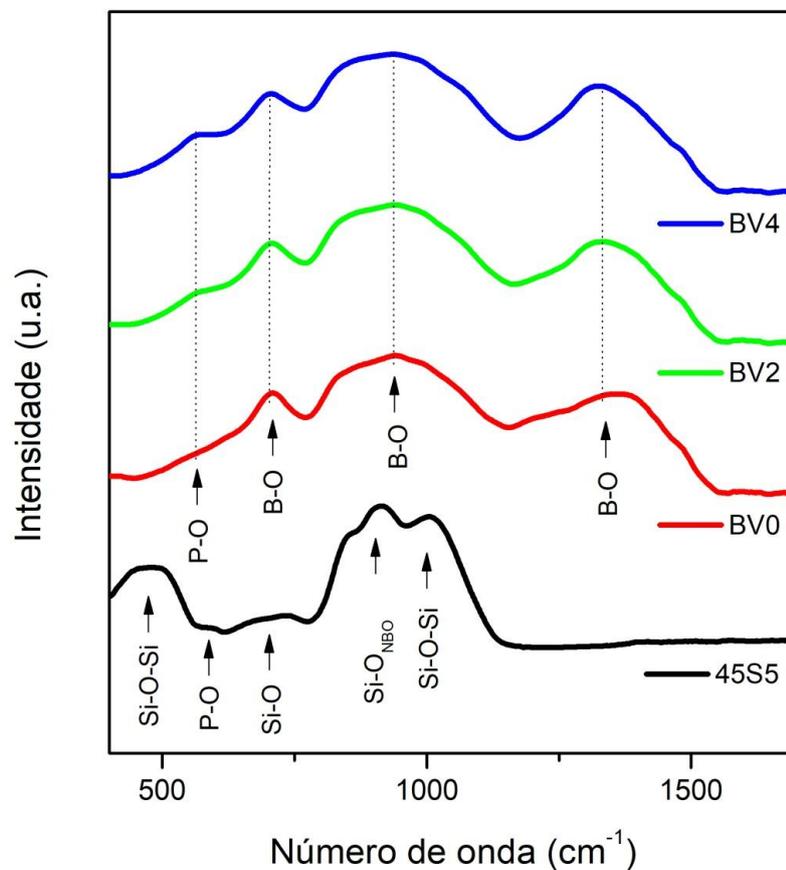
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise *in vitro*

#### 5.1.1 Antes da imersão em SBF

Para as amostras de biovidros a base de borato é possível identificar quatro regiões de destaque nos espectros. Três delas se repetem em todas as amostras, com bandas que se concentram em torno de 620-770, 770-1150 e 1150-1550  $\text{cm}^{-1}$ . É possível observar uma banda presente apenas em BV2 e BV4 com o centro em aproximadamente 565  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4).

Os modos vibracionais correspondentes aos grupos borato são conhecidos por serem ativos em três regiões específicas (Manupriya *et al.*, 2007; Margha e Abdelghany, 2012; Abdelghany e Kamal, 2014): 1200–1500  $\text{cm}^{-1}$ : originários de estiramentos B–O de unidades trigonais  $\text{BO}_3$ , 850–1200  $\text{cm}^{-1}$ : originários de estiramentos B–O de unidades tetraédricas  $\text{BO}_4$  e 600–800  $\text{cm}^{-1}$ : originários de flexões de várias unidades borato  $\text{BO}_3$ .



**Figura 4.** Espectros de FTIR-ATR dos biovidros a base de sílica (45S5), de borato com 4% de fosfato (BV4), borato com 2% de fosfato (BV2) e de borato sem fosfato (BV0) antes da imersão em SBF.

A Tabela 2 detalha as atribuições referentes às bandas dos biovidros de borato observadas na Figura 4. A pequena diferença entre as amostras se restringe à banda em torno de  $565\text{ cm}^{-1}$ , proveniente de flexões P-O de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  (Koutsopoulos, 2002). Modos vibracionais referentes à água também estão presentes em todas as amostras. Mesmo que muito fracas, elas são responsáveis pela pequena banda em torno de  $1600\text{ cm}^{-1}$  (Manupriya *et al.*, 2007; Margha e Abdelghany, 2012).

**Tabela 2.** Bandas (e suas respectivas atribuições) encontradas nos espectros de FTIR-ATR dos biovidros borato com 4, 2 ou 0% de fosfato.

Banda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição	Referência
600-800	Diborato, triborato, tetraborato e pentaborato	Manupriya <i>et al.</i> , 2007; Margha e Abdelghany, 2012; Samudrala <i>et al.</i> , 2017
850-1200	Diborato, triborato, tetraborato e pentaborato	Manupriya <i>et al.</i> , 2007; Margha e Abdelghany, 2012
1200-1550	Cadeias e anéis metaborato, piroborato e ortoborato	Manupriya <i>et al.</i> , 2007; Pascuta <i>et al.</i> , 2010
565	Flexões de ligações P-O de grupos PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Koutsopoulos, 2002; Manupriya <i>et al.</i> , 2007
1600	Água molecular	Koutsopoulos, 2002; Manupriya <i>et al.</i> , 2007; Samudrala <i>et al.</i> , 2017

Foi observado um espectro FTIR-ATR diferenciado para o biovidro 45S5, pois apresenta bandas características de vidros silicato (Aina *et al.*, 2013). Nota-se duas bandas entre 400-560 e 620-770 cm<sup>-1</sup>, além de outra, com menor intensidade, centrada em torno de 590 cm<sup>-1</sup>. O restante do espectro é demarcado pela forte presença de duas bandas situadas entre 780-960 e 960-1190 cm<sup>-1</sup>, com um pequeno ombro próximo de 850 cm<sup>-1</sup>. As atribuições pertinentes ao espectro do 45S5 são listadas na Tabela 3.

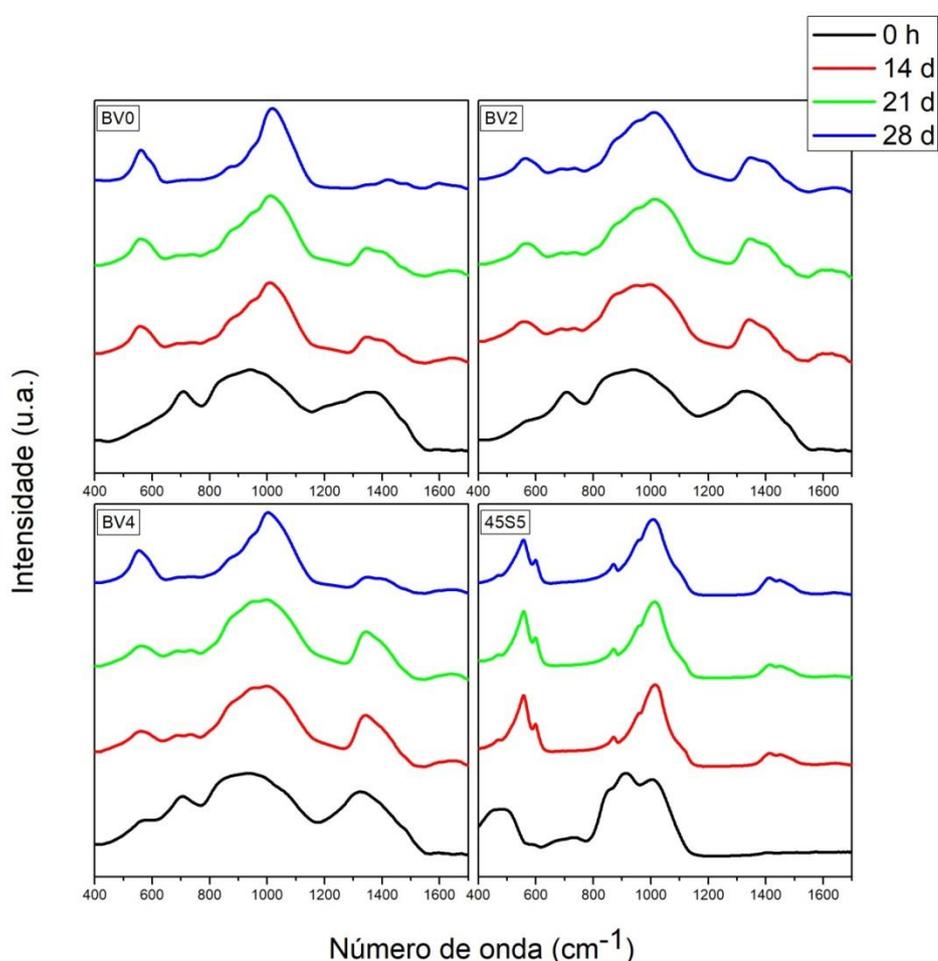
#### 5.1.2 Após imersão em SBF

Após o procedimento de imersão em SBF, houve o crescimento de uma camada sobre os biovidros. Esta camada foi submetida à análise em FTIR-ATR e os resultados da evolução temporal dos espectros de cada amostra estão expostos na Figura 5.

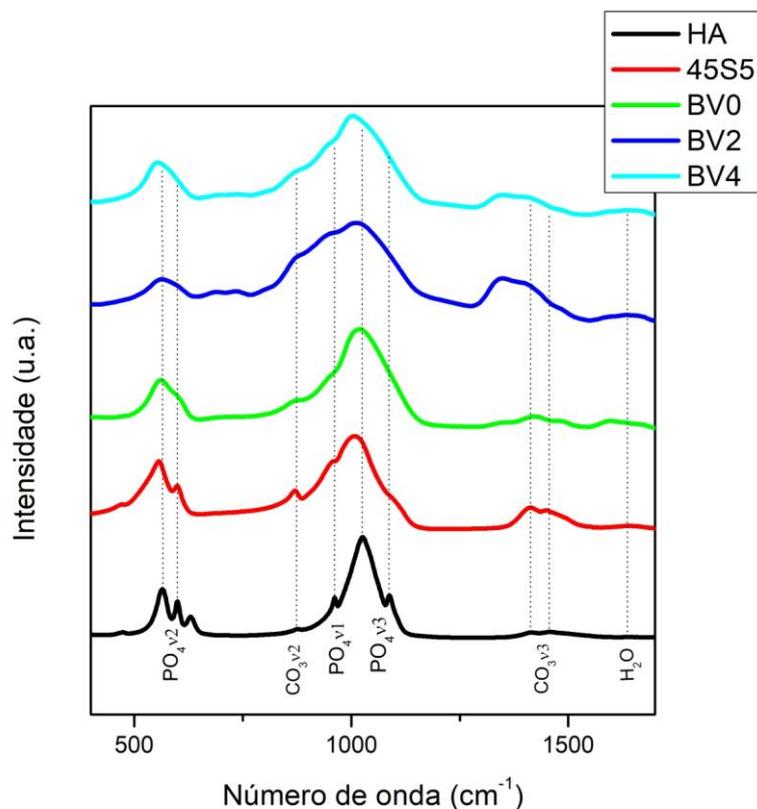
A Figura 6 mostra os espectros resultantes da imersão das amostras por 28 dias, e o espectro da hidroxiapatita (HA) de peixe, usada como controle. As bandas referentes a HA foram discriminadas com uma linha tracejada e sua respectiva atribuição.

**Tabela 3.** Bandas encontradas no espectro de FTIR-ATR do 45S5 (biovidro a base de sílica) e suas respectivas atribuições.

Banda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição	Referência
400-560	Flexões de ligações Si-O	Hench, 1991; Boccaccini <i>et al.</i> , 2007; Ouis <i>et al.</i> , 2012
590	Flexões de ligações P-O de grupos PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Koutsopoulos, 2002; Boccaccini <i>et al.</i> , 2007; Manupriya <i>et al.</i> , 2007
620-770	Flexões de ligações Si-O	Ouis <i>et al.</i> , 2012
775-1170	Estiramentos de ligações Si-O com pontes de oxigênio não ligantes (NBO)	Boccaccini <i>et al.</i> , 2007; Ouis <i>et al.</i> , 2012; Hoppe <i>et al.</i> , 2013
960-1190	Estiramento de ligações Si-O-Si	Boccaccini <i>et al.</i> , 2007; Ouis <i>et al.</i> , 2012
1600	Água molecular	Koutsopoulos, 2002; Manupriya <i>et al.</i> , 2007; Samudrala <i>et al.</i> , 2017



**Figura 5.** Comparação dos espectros de FTIR-ATR dos biovidros a base de sílica (45S5), a base de borato com 4% (BV4), 2% (BV2) ou 0% (BV0) de fosfato, antes (0h) e após imersão em SBF por 14, 21 e 28 dias



**Figura 6.** Comparação dos espectros FTIR-ATR da HA com os das camadas crescidas sobre os biovidros a base de sílica (45S5), a base de borato com 4% (BV4), 2% (BV2) ou 0% (BV0) de fosfato após 28 dias de imersão em SBF.

Nos biovidros de borato houve uma diminuição das bandas em torno de 620-770 e 1150-1550  $\text{cm}^{-1}$ . Essa redução foi mais evidente em BV0 e menos em BV2. Também houve o aumento gradativo de uma banda entre 480-640  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída a flexões P-O de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  (Koutsopoulos, 2002; Han e Day, 2007; Samudrala, 2017). Todas as camadas também apresentaram um ombro próximo a 955  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a estiramentos P-O de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  (Vallet-Regí *et al.*, 1999; Koutsopoulos, 2002; Manupriya *et al.*, 2007; Margha e Abdelghany; 2012), mais evidente em 45S5. Paralelamente a estas bandas, outros grupos fosfato ganharam forma em todas as amostras, com bandas centradas em torno de 1012  $\text{cm}^{-1}$ . Apenas o biovidro 45S5 apresentou um ombro em 1090  $\text{cm}^{-1}$ . Ambas as bandas, 1012 e 1090  $\text{cm}^{-1}$ , são atribuídas a estiramentos P-O de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  de modo v3 degenerado.

Concomitantemente à formação dos novos grupos fosfato, houve a formação de grupos carbonato, com características observadas em todas as amostras devido ao crescimento de um ombro em torno de 870  $\text{cm}^{-1}$ , que foi uma banda bem definida para o 45S5. Seu surgimento é atribuído a flexões de ligações C-O de grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  (Yao *et al.*,

2009). A análise de BV0 e de 45S5, revelou a presença de bandas de carbonato com centros aproximados em 1413 e 1460  $\text{cm}^{-1}$ , referentes a estiramentos de ligações C-O de grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  (Vallet-Regí *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2007; Oudadesse *et al.*, 2011).

## 5.2 Avaliação clínica dos animais

Os animais ficaram em observação, aquecidos, até a recuperação da anestesia. A seguir, foram levados ao biotério e acompanhados diariamente até o dia da eutanásia. Durante este período não foi observada qualquer alteração no sítio cirúrgico ou de comportamento.

## 5.3 Análise histológica

A seguir será feita uma análise descritiva geral dos defeitos, nos três períodos estudados

### 5.3.1 Análise de 15 dias

Neste período os grânulos presentes encontravam-se dispersos por todo o defeito, entremeados por um tecido conjuntivo bastante celularizado e vascularizado. A maioria dos grânulos apresentou-se envolvido por células gigantes e parte dos grânulos foi total ou parcialmente substituído por um tecido conjuntivo frouxo, delicado, vascularizado e com células de núcleos levemente basofílicos.

A formação óssea ocorreu no perióstio, onde foram encontradas formações de tecido ósseo primário de tamanhos variados. Além disso houve algum crescimento, a partir das margens, osteocondução e crescimento aposicional sobre o osso remanescente. Não foi observado infiltrado inflamatório em nenhum animal avaliado (Figura 7)

### 5.3.2 Análise de 45 dias

Aos 45 dias, os defeitos apresentaram características semelhantes às aquelas descritas aos 15 dias. Notou-se uma redução na quantidade de grânulos preenchendo os defeitos. Encontravam-se concentrados nas margens dos defeitos ou ao redor do seio sagital. Células gigantes multinucleadas encontravam-se isolando os materiais.

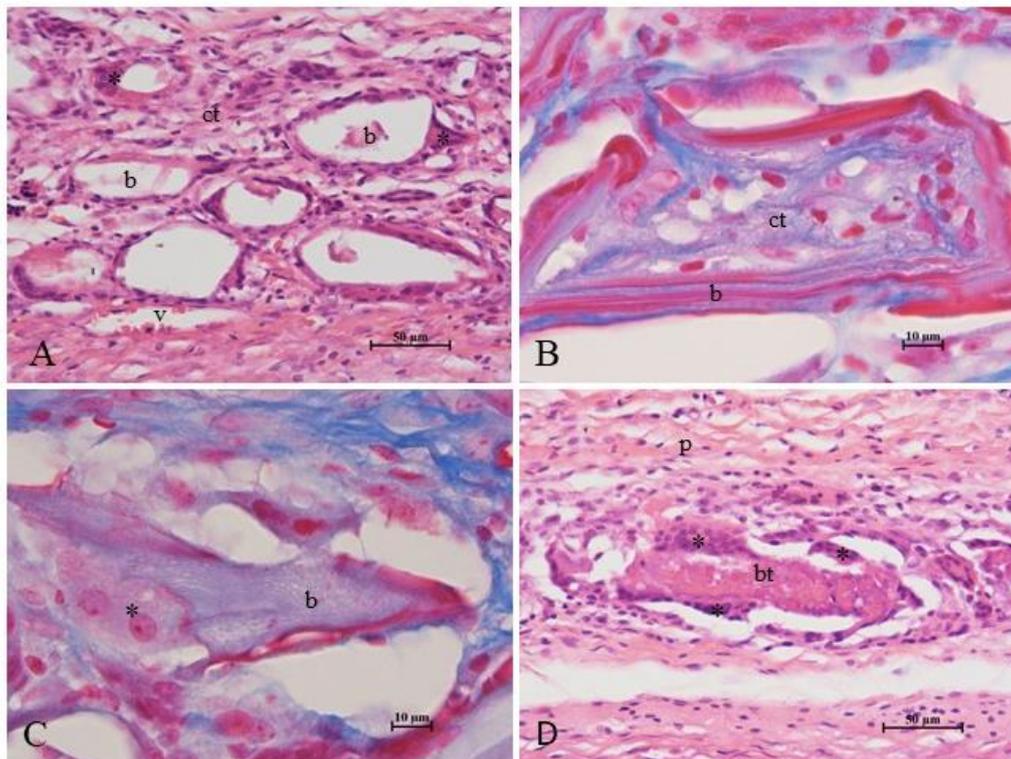
Neste período, com maior frequência do que aquela observada aos 15 dias, muitos espaços antes ocupados pelos materiais foram preenchidos por tecido conjuntivo, sobre o qual foram encontradas células gigantes multinucleadas e em alguns casos havia uma deposição de matriz óssea no centro das cavidades.

O tecido conjuntivo presente entre os grânulos apresentou-se mais denso próximo às margens, ao perióstio e às regiões onde havia formação óssea, em comparação aos 15 dias. Além disso, era ricamente celularizado e vascularizado. O tecido ósseo primário, mais frequente aos 15 dias, apareceu de forma mais esporádica aos 45 dias (Figura 8 A, B e C).

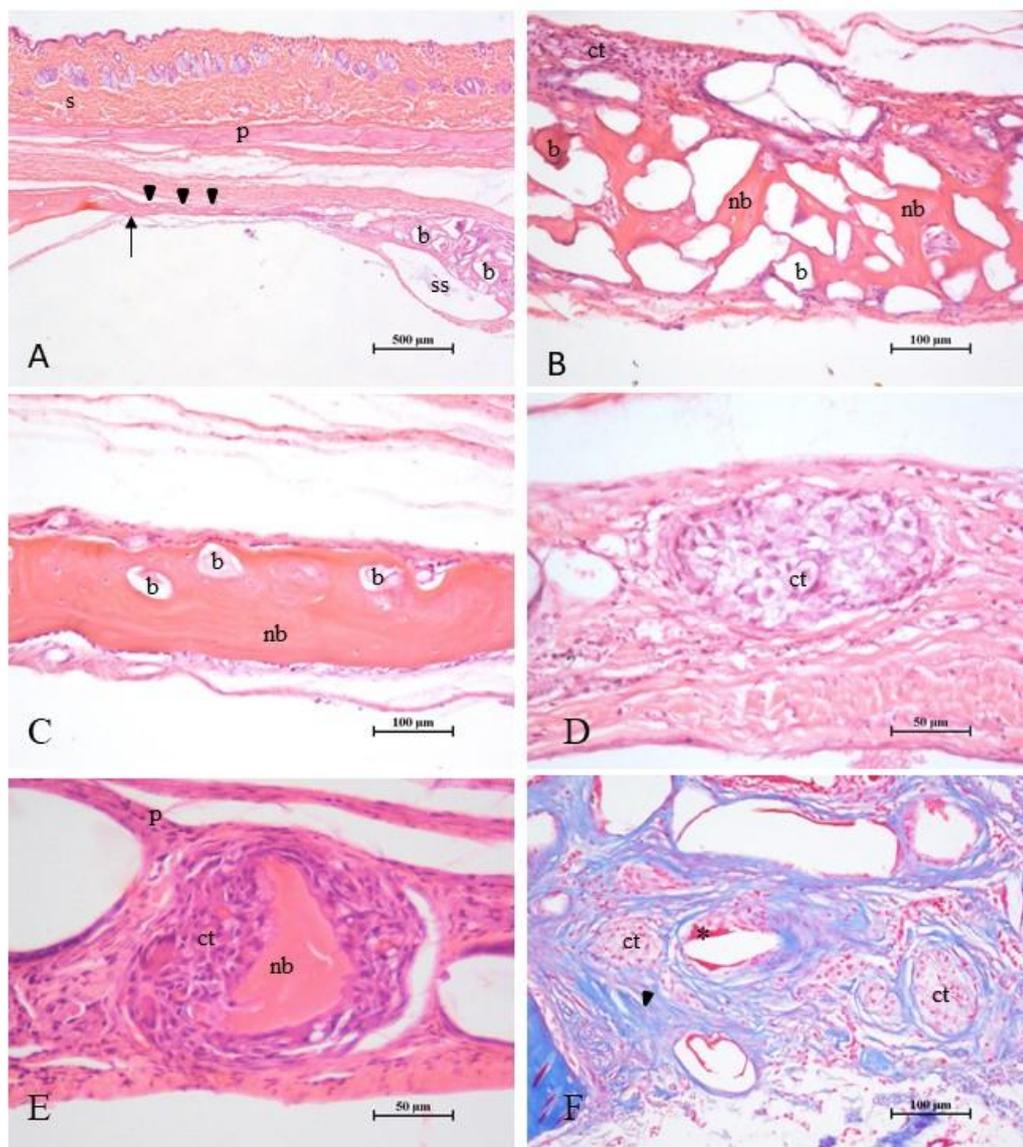
### 5.3.3 Análise de 60 dias

Da mesma forma que nos períodos anteriores, o material remanescente encontrava-se esparso no defeito e isolado por células gigantes. Os espaços deixados pelo material eram preenchidos por tecido conjuntivo frouxo (basófilo), de forma semelhante aos 45 dias. Contudo houve maior deposição de matriz óssea no centro dos espaços, em comparação aos 45 dias.

O crescimento ósseo a partir das margens não superou aquele observado no período anterior. Observou-se, também, crescimento aposicional e remodelação óssea nas margens do defeito. O defeito estava preenchido por um tecido predominantemente mais denso que nos períodos anteriores, especialmente em regiões onde não havia material (Figura 8 D, E e F).



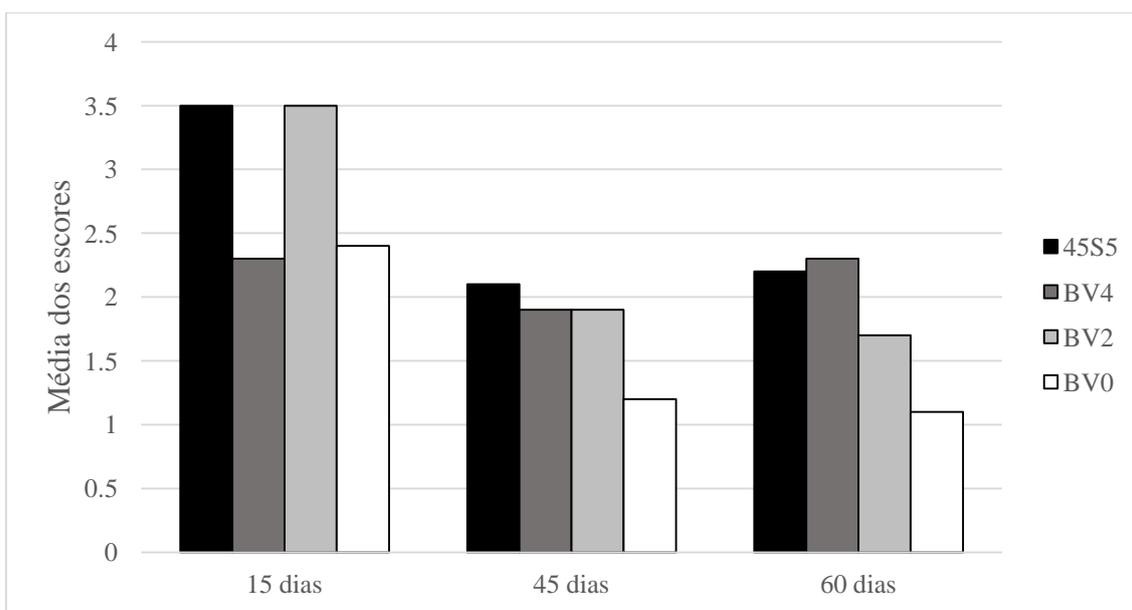
**Figura 7.** Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico de calvária de ratos 15 dias após enxerto com biovidro a base de sílica (45S5), ou de borato com 4% de fosfato (BV4), ou borato com 2% de fosfato (BV2) ou de borato sem fosfato (BV0). As fotomicrografias são representativas do período, pois as características são descritas para todos os grupos. Observa-se em (A) os grânulos do biomaterial (b) envolvidos por células gigantes (\*) e entremeados por um tecido conjuntivo ricamente celularizado (ct) e rico em vasos sanguíneos (v). Em (B), nota-se um tecido conjuntivo frouxo rico em células (ct) substituindo o material (b). Em (C), o biomaterial está sendo reabsorvido por célula gigante. Observa-se em (D) tecido ósseo primário (bt) circundado por células gigantes. Aumento original: 40x (A e D), 100x (B e C). H&E (A a D), Azan (B e C). p: periósteo.



**Figura 8.** Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico de calvária de ratos 45 dias (A, B e C) e 60 dias (D, E e F) após enxerto com biovidro a base de sílica (45S5) ou de borato com 4% (BV4), ou 2% (BV2) ou 0% (BV0) de fosfato. As fotomicrografias são representativas do período, pois as características são descritas para todos os grupos. Nota-se em (A) que os grânulos (b) estão mais concentrados próximo ao seio sagital (ss), a presença de um tecido conjuntivo mais denso (cabeça de seta) e pouco crescimento a partir da margem (seta). Em (B), formação de tecido ósseo (nb) entre os grânulos. Em (C), observa-se crescimento por osteocondução. Em (D, E e F), o espaço deixado pelo material está sendo preenchido por um tecido conjuntivo frouxo (ct) sobre o qual, em alguns casos, ocorreu deposição de matriz óssea (nb). Observa-se em (F), a presença de um tecido conjuntivo denso próximo a margem (cabeça de seta). Aumento original: 4x (A), 20x (B, C e F), e 40x (D e E). H&E (A a E), Azan (F). s: pele, p: perióstio.

#### 5.4 Avaliação da relação entre composição química e decomposição/reabsorção dos materiais.

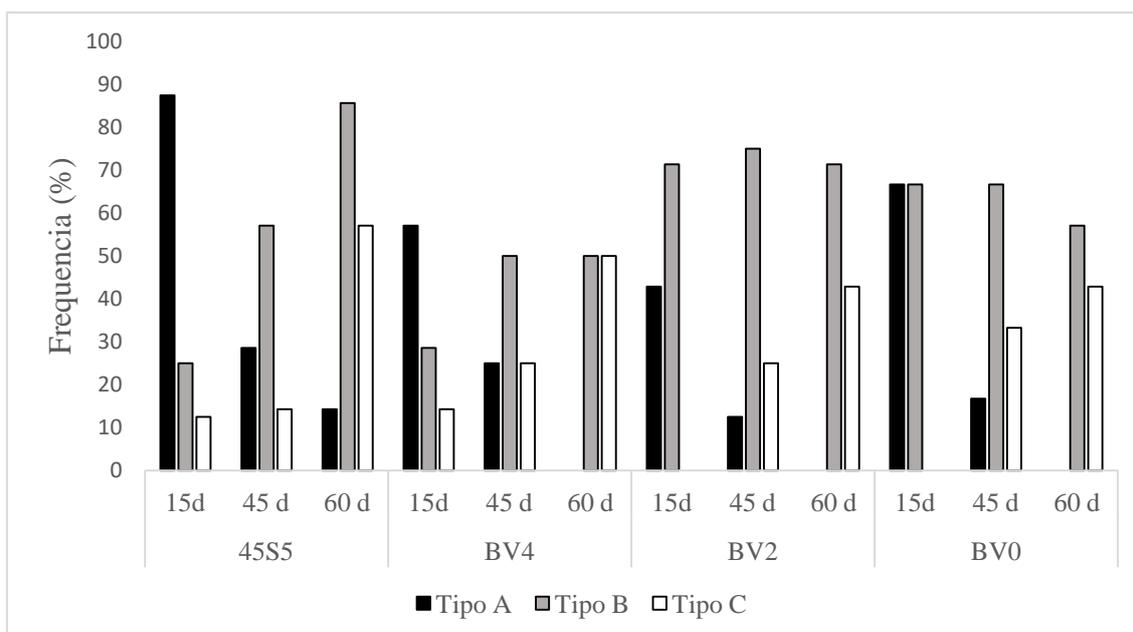
A Figura 9 representa os escores relacionados com a presença de grânulos nos defeitos ósseos nos diferentes grupos, ao longo do período experimental. A avaliação semi-quantitativa demonstrou que os grânulos sem fosfato foram reabsorvidos mais rapidamente ( $2,4 \pm 1,1$  aos 15 dias;  $1,2 \pm 0,4$  aos 45 dias e  $1,1 \pm 0,4$  aos 60 dias).



**Figura 9.** Escores representativos da presença de grânulos em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos após enxerto com biovidro a base de sílica (45S5), de borato com 4% de fosfato (BV4), borato com 2% de fosfato (BV2) e de borato sem fosfato (BV0). Os animais foram analisados aos 15, 45 e 60 dias após o enxerto. A presença dos grânulos foi classificada da seguinte forma: (a) Muitos grânulos (escore 4) (b) Quantidade moderada de grânulos (escore 3); (c) Poucos grânulos (escore 2); (d) Ausência de grânulos (escore 1). Os valores são representados como média  $\pm$ dp.

#### 5.5 Avaliação da relação entre composição química dos grânulos e tipos de formação óssea.

A Figura 10 apresenta as frequências relativas das formações ósseas observadas aos 15, 45 e 60 dias em cada grupo estudado. Ao longo do período do experimento, ocorreu diminuição na frequência de tecido ósseo primário (Tipo A) em todos os grupos. Aos 60 dias predominaram as ilhotas, na dura máter (Tipo B), seguidas das deposições de matriz em substituição aos grânulos (Tipo C).



**Figura 10.** Frequência relativa dos tipos de formações ósseas, classificadas em (Tipo A): presença de tecido ósseo primário irregular; Tipo (B), presença de ilhotas ósseas formadas pela deposição lamelar de matriz, localizadas na dura máter, de formação arredondada ou oval, circundadas por osteoblastos; Tipo (C) depósitos de matriz localizados em áreas ocupadas anteriormente pelos grânulos de biomaterial. As formações foram observadas 15, 45 e 60 dias após o enxerto com biovidro a base de sílica (45S5) ou biovidro a base de borato com 4% (BV4), 2 % (BV2) ou sem fosfato (BV0) em defeitos de tamanho crítico de calvária de ratos.

## 6 DISCUSSÃO

Os vidros bioativos são materiais com potencial angiogênico e osteogênico que podem ter sua composição modificada para aprimorar suas propriedades (Zahid *et al.*, 2016). Neste estudo, amostras de biovidro a base de borato, com diferentes concentrações de fosfato foram avaliadas *in vitro*, por meio de medidas de absorção de infravermelho via transformada de Fourier (FTIR) com Reflexão Total Atenuada (ATR). O processo de regeneração óssea foi estudado *in vivo*, sob microscopia óptica, após enxerto com esses materiais em defeitos de tamanho crítico, na calvária.

O enxerto, na forma granulada foi distribuído uniformemente por todo o defeito. Em geral, as partículas fornecem um espaço ideal para que ocorra a angiogênese e osteogênese e facilitam o preenchimento dos defeitos ósseos (Liu e Kerns, 2014; Jones, 2015). Em um estudo *in vitro*, em solução de TRIS, Cerruti *et al.* (2005) observaram a dissolução de partículas de biovidro a base de sílica (45S5), de 2, 16 e 90  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e concluíram que as trocas iônicas com o meio e o aumento no pH ocorreram mais rapidamente quando empregadas partículas menores e que, nas partículas maiores, a camada de fosfato de cálcio que se formou na superfície do biomaterial foi mais espessa.

Neste estudo o tamanho das partículas variou de 45 a 212 $\mu\text{m}$ . Após a tamisação, a distribuição dos grânulos por tamanho foi similar, com uma maior prevalência de grânulos de 45 a 90 $\mu\text{m}$  em todos os grupos. Esta padronização é importante, pois diferenças nos tamanhos das partículas podem interferir na bioatividade (Wheeler *et al.*, 1998; Tamjid *et al.*, 2011, Ajita *et al.*, 2015) e na taxa de degradação, devido a variações na área exposta (Jensen *et al.*, 2015). Dessa forma, o tamanho dos grânulos não representou um fator que pudesse influenciar na comparação dos resultados entre os grupos e as diferenças observadas na reabsorção foram atribuídas às variações em sua composição.

O 45S5 foi escolhido como controle positivo, pois desde o desenvolvimento do BioGlass 45S5®, em 1969, vários estudos comprovaram sua bioatividade (Hench *et al.*, 1971; Chen *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2008; Tiomis, 2010). Ensaios clínicos demonstraram a eficácia da utilização do BioGlass 45S5® na forma granulada como substituto ósseo (Grover, 2013; Naqvi *et al.*, 2017). Os produtos da dissolução do 45S5Bioglass® foram capazes de aumentar, *in vitro*, a expressão do Fator de Crescimento da Insulina II (*Insulin-like Growth Factor II- IGF-II*), um indutor de proliferação dos osteoblastos (Xynos *et al.*, 2000).

Os biovidros a base de borato promovem um ambiente favorável para a adesão e a proliferação celular, *in vitro* (Marion *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2014; Ajita *et al.*, 2015), e sofrem degradação contínua quando imersos em SBF, liberando boro para o meio (Liu *et al.*, 2013). Demonstramos que, após a imersão em SBF, as primeiras bandas a diminuírem a intensidade foram aquelas que representaram modos vibracionais infravermelho ativos de unidades  $\text{BO}_3$ , com centros em torno de 700 e 1400  $\text{cm}^{-1}$ . Este resultado está de acordo com o fato de que as unidades de coordenação triangular, são mais suscetíveis ao ataque da solução, ao contrário das quadraédricas  $\text{BO}_4$ , que persistem por mais tempo e são representadas pela banda centrada em torno de 945  $\text{cm}^{-1}$  (Abdelghany e Kamal, 2014).

A concentração de borato é um fator que influencia a conversão em apatita. Quanto maior a concentração, mais rápida é a conversão, entretanto, menor é a biocompatibilidade do material. Altas concentrações de boro (acima de 2,5mM) em meio estático, inibem a proliferação celular (Brown *et al.*, 2008).

Neste estudo, empregou-se uma concentração de 60% de  $\text{B}_2\text{O}_3$  e a regeneração ocorreu sem desenvolvimento de resposta inflamatória ou qualquer característica que denotasse efeito tóxico do borato, confirmando a biocompatibilidade do biomaterial.

Outros estudos *in vivo* relataram a formação óssea após enxerto com biovidro contendo borato (Gorustovich *et al.*, 2006; Bi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). O aumento na quantidade de osso formado parece ser proporcional à substituição da sílica por borato (Bi *et al.*, 2012).

A vantagem da adição de fosfato nos biovidros ainda é uma questão controversa. É consenso que a sua adição resulta em maior conectividade entre as moléculas do biomaterial, com conseqüente aumento da resistência à dissolução e redução da sua bioatividade, que é representada pela formação da camada de apatita na superfície do biovidro (Tilocca e Cormack, 2007; Mercier *et al.*, 2011). Entretanto, há autores que defendem que mesmo com o aumento da conectividade o processo de formação da apatita ocorre mais rapidamente na presença dos fosfatos (O'Donnel *et al.*, 2009; Mneimme *et al.*, 2011).

A análise em FTIR-ATR, antes da imersão, mostrou a presença de uma banda em torno de  $565\text{ cm}^{-1}$ , proveniente de flexões P-O de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  (Koutsopoulos, 2002), mais proeminente em BV4 do que em BV2, o que confirma a concentração crescente de fosfato nestas amostras (Figura 4).

Após 28 dias de imersão em SBF, foi possível observar a presença de modos vibracionais característicos da HA para os biovidros de borato e o 45S5. A banda que cresceu em torno de  $480\text{-}640\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída a flexões P-O de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  (Koutsopoulos, 2002; Han e Day, 2007; Samudrala, 2017), e o seu surgimento é tido como uma confirmação da nucleação da HA (Koutsopoulos, 2002; Manupriya *et al.*, 2007; Margha e Abdelghany, 2012; Deliormanli, 2013). O 45S5 apresentou duas bandas bem definidas em torno de  $557\text{ e }600\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas a flexões P-O de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ . Quanto mais intensas e distintas entre si, mais cristalina é a HA formada (Jones *et al.*, 2001; Saravanapavan *et al.*, 2003). Para as outras amostras, a banda em torno de  $600\text{ cm}^{-1}$ , aparece apenas como um pequeno ombro. A sua presença em forma de ombro ou ausência, pode representar uma HA pouco cristalina ou uma fase amorfa precursora de sua formação (Manupriya *et al.*, 2007; Deliormanli, 2013).

O FTIR-ATR também detectou a formação de grupos carbonato pertencente a HÁ, em todas as amostras, observados como um ombro em torno de  $870\text{ cm}^{-1}$ . Isto evidencia que a camada de fosfato de cálcio formada sobre o biovidro é carbonatada (Yao *et al.*, 2007; Lucacel *et al.*, 2010; Oudadesse *et al.*, 2011). Essa hidroxiapatita carbonatada ou hidroxicarbonato de apatita (HCA) se assemelha à hidroxiapatita natural encontrada nos ossos, esmalte e dentina (Kaur *et al.*, 2013). Após a imersão em SBF as

bandas correspondentes à água se tornaram mais evidentes. O alargamento destas bandas pode ser resultado da hidrólise que ocorre durante as trocas iônicas entre o biovidro e o SBF (Manupriya *et al.*, 2007).

O estudo *in vitro* mostrou que as alterações mais significativas ocorreram nas amostras BV0. Quando comparado ao controle 45S5, o biovidro BV0 foi aquele que apresentou a dissolução mais rápida e que desenvolveu, ao longo dos 28 dias de observação, uma camada de apatita mais próxima à HA cristalina. Embora BV2 e BV4 também tenham apresentado a formação da apatita, sua dissolução foi mais lenta. A análise em FTIR-ATR revelou, também, que a camada formada em BV2 conservou por mais tempo a forma das bandas originárias do biovidro borato, de modo a sobrepor e atenuar as bandas de fosfatos e carbonatos. Um estudo *in vitro* empregando biovidros de borato com 0%, 2%, 4% e 6% de fosfato mostrou que aquele com 2% apresentou a maior durabilidade, sugerindo que uma pequena adição de fosfato parece aumentar a durabilidade química dos biovidros (Manupriya *et al.*, 2007).

No estudo *in vivo*, a análise da frequência de grânulos demonstrou que a presença de fosfato nos biovidros interferiu na sua reabsorção, ao longo de um período de 60 dias, de modo a retardá-la. Os defeitos preenchidos com BV0 apresentaram a menor frequência após 60 dias. Nos defeitos preenchidos com BV2 a redução no escore foi detectada a partir de 45 dias se mantendo estável até os 60. Os escores para BV4 apareceram reduzidos desde os 15 dias, mantendo-se estáveis até os 60 dias. Esses resultados dão suporte àqueles observados *in vitro*.

A degradação dos materiais é um processo físico de desintegração e fragmentação enquanto a reabsorção significa a biodegradação por meio de mecanismos celulares (Sheikh *et al.*, 2015). No estudo *in vivo*, a maioria dos grânulos apresentou-se envolvidos por células gigantes multinucleadas. A presença destas células está relacionada à solubilidade do material e, portanto, aos seus produtos de degradação (Vogel *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2011; Sheikh *et al.*, 2015).

O DTC é um dos modelos mais utilizados para avaliar o processo de regeneração óssea (Vajgel, 2013). Um DTC é compreendido como o menor tamanho de defeito ósseo que não se regenera completamente e espontaneamente durante o ciclo de vida do animal (Schmitz e Hollinger, 1986). Neste estudo, além do crescimento ósseo a partir das margens houve a formação de tecido primário no perióstio, formação de ilhotas ósseas na dura-máter e substituição óssea nos grânulos. Todos os grupos apresentaram

as mesmas características de formação óssea, entretanto houve variação na frequência destas formações.

O desenvolvimento de tecido ósseo primário periosteal ocorre em resposta ao trauma e, embora menos mineralizado que o tecido ósseo lamelar, é o responsável pela rápida recuperação da força mecânica na região do defeito (Uthgenannt *et al.*, 2007) e sua maior frequência é observada no início do processo de regeneração (Gabbai-Armelin *et al.*, 2015). Este tecido apareceu no perióstio como massas amorfas, acidófilas, com organização irregular. No grupo 45S5, controle positivo, a maior frequência destas estruturas foi observada aos 15 dias com declínio nos períodos subsequentes. Embora os demais grupos tenham seguido a mesma dinâmica, nos grupos borato com fosfato a frequência de tecido ósseo primário foi aparentemente menor em comparação ao 45S5 e ao BV0.

A formação óssea característica da região da dura-máter foram as ilhotas ósseas. Estas ilhotas foram mais frequente nos grupos borato do que no grupo controle aos 15 dias. Dentre os grupos borato, o BV2 e BV0 apresentaram as maiores frequências de ilhotas, sendo BV2 ligeiramente superior a BV0, enquanto o BV4 apresentou menor número em comparação aos grupos anteriores. Este resultado sugere que a concentração de fosfato pode ter interferido no desenvolvimento das ilhotas.

A relação entre as concentrações de cálcio e fósforo é importante para interpretar este resultado, pois estes minerais são os principais componentes da matriz óssea inorgânica (Titorecu *et al.*, 2014). Um aumento da concentração de CaO e diminuição da concentração de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ou seja, uma maior relação CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, *in vitro*, resulta em uma maior liberação de íons Ca<sup>+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> com consequente aumento na bioatividade (Kiran *et al.*, 2017). No presente estudo, dentre os biovidros a base de borato, o que apresentou menor frequência de ilhotas em todos os tempos avaliados foi o BV4, que apresenta a menor relação CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (3,25). Apesar de BV0 ter a maior relação CaO/ P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (15% de CaO e 0% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) foi o material que sofreu a maior biodegradação *in vivo*, o que certamente pode ter reduzido sua bioatividade nesta condição pois o material deve fornecer o suporte adequado para o crescimento ósseo (Bohner, 2010).

O espaço existente entre os grânulos foi preenchido por um tecido conjuntivo ricamente celularizado e vascularizado, carregando consigo células osteogênicas, visto que no espaço entre os grânulos e naquele deixado pelos grânulos, após sua reabsorção, houve formação de tecido ósseo.

A frequência de depósitos de matriz óssea substituindo os grânulos foi quantificada. Os grânulos de BV4 e BV0 sofreram a maior biodegradação na fase aguda da regeneração, entretanto somente BV4 apresentou tecido ósseo substituindo grânulos neste período, o que sugere que a maior concentração de fosfato do grupo BV4 pode ter influenciado a formação mais precoce de matriz óssea. No entanto, aos 60 dias, a frequência destas formações nos grupos borato foi semelhante.

A maior parte do processo de regeneração óssea está relacionado à osteoindução (Albrektsson e Johansson, 2001). Nesse contexto, a dura-máter desempenha um papel significativo, pois é a principal fonte de células osteoprogenitoras (Gosain *et al.*, 2003). A capacidade osteoindutora do biovidro borato já foi previamente descrita *in vitro* (Zhang *et al.*, 2015). A formação de tecido ósseo maduro independente da margem do defeito indica que as três formulações propostas neste estudo foram bioativas. Entretanto, o grupo BV2 apresentou a maior frequência de ilhotas dentre os grupos borato, aumento da frequência de deposição de matriz em substituição ao grânulo ao longo do tempo e menor dissolução *in vitro*. Estes resultados sugerem que a adição de 2% de fosfato nesta formulação resultou em um material mais estável e com maior bioatividade, comparado aos biovidros borato com 4% e sem fosfato.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nas análises *in vitro* e *in vivo*, pode-se concluir que concentrações diferentes de fosfato, alteraram o processo de dissolução do biovidro a base de borato e que, uma pequena adição de fosfato aumentou a estabilidade do biomaterial, resultando em uma melhor bioatividade.

## 8 REFERÊNCIAS

Abdelghany AM, Kamal H. Spectroscopic investigation of synergetic bioactivity behavior of some ternary borate glasses containing fluoride anions. *Ceramics international*. 2014; 40 (6): 8003-8011.

Adams LA, Essien ER, Adesalu AT, Julius ML. Bioactive glass 45S5 from diatom biosilica. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2017; 2 (4): 476-482.

Aina V, Cerrato G, Martra G, Bergandi L, Costamagna C, Ghigo D, Malavasi G, Lusvardi G, Menabue L Gold-containing bioactive glasses: a solid-state synthesis to produce alternative biomaterials for bone implantations. *Journal of The Royal Society Interface*. 2013; 10 (82): 20121040.

Ajita J, Saravanan S, Selvamurugan N. Effect of size of bioactive glass nanoparticles on mesenchymal stem cell proliferation for dental and orthopedic applications. *Materials Science and Engineering C*. 2015; 53: 142–149.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001; 10 Suppl 2: S96-101.

Aliske MA. Medidas de espectroscopia no infravermelho médio para a determinação do teor de biodiesel em óleo diesel. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Paraná.

Andrade ADA, Marinho CF, Barcelos M, Zorzal MB, Conz MB, Vidigal Junior GM. Biologia óssea: uma revisão da literatura. *ImplantNews*. 2007; 4 (6): 659-662.

Araújo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Osss collagen: A 6-month study in the dog. *Clin. Oral Impl. Res*. 2009; 20: 433-440.

Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*. 1995; 17 (2 Suppl): 77S-83S.

Bassi F, Poli PP, Rancitelli D, Signorino F, Maiorana C. Surgical Treatment of Peri-Implantitis: A 17-Year Follow-Up Clinical Case Report. *Case Rep Dent*. 2015; 2015: 574-676. doi: 10.1155/2015/574676.

Bi L, Jung S, Day D, Neidig K, Dusevich V, Eick D, Bonewald L. Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(12):3267-75. doi: 10.1002/jbm.a.34272.

Bi L, Rahaman MN, Day DE, Brown Z, Samujh C, Liu X, Mohammadkhah A, Dusevich V, Eick JD, Bonewald LF. Effect of bioactive borate glass microstructure on bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in a rat calvarial defect model. *Acta Biomater*. 2013; 9(8): 8015-26. doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.043.

Bingel L, Groh D, Karpukhina N, Brauer DS. Influence of dissolution medium pH on ion release and apatite formation of Bioglass 45S5. *Materials Letters*. 2015; 143 (15): 279-282.

Boccaccini AR, Chen Q, Lefebvre L, Gremillard L, Chevalier J. Sintering, crystallisation and biodegradation behaviour of Bioglass®-derived glass-ceramics. *Faraday discussions*. 2007; 136: 27-44.

Bohner M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. *Eur Cell Mater*. 2010; 20: 1-12.

Bonadio TGM, Freitas VF, Tominaga TT, Miyahara RY, Rosso JM, Cótica LF, Baesso ML, Weinand, WR, Santos IA, Guo R, Bhalla AS. . Polyvinylidene fluoride/hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate multifunctional biocomposite: Potentialities for bone tissue engineering. *Current Applied Physics*. 2017; 17: 767-773.

Borg TD, Mealey BL. Histologic healing following tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus combined mineralized-demineralized freeze-

dried bone allograft: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2015; 86 (3): 348-55. doi: 10.1902/jop.2014.140483

Bortoluzzi MC, Manfro R, Fabris V, Ceconello R, Derech ED. Comparative study of immediately inserted dental implants in sinus lift: 24 months of follow-up. *Ann Maxillofac Surg.* 2014; 4 (1): 30-3. doi: 10.4103/2231-0746.133071.

Brown RF, Rahaman MN, Dwilewicz AB, Huang W, Day DE, Li Y, Bal BS. Effect of borate glass composition on its conversion to hydroxyapatite and on the proliferation of MC3T3-E1 cells. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 88(2): 392-400. doi: 10.1002/jbm.a.31679.

Cerruti M.G. Characterization of bioactive glasses. Effect of the immersion in solutions that simulate body fluids. 2004. 228f. Tese (Ph.D. em Ciências Químicas) – Universidade de Turin, Itália. 2004.

Cerruti MG, Greenspan D, Powers K. An analytical model for the dissolution of different particle size samples of Bioglass in TRIS-buffered solution. *Biomaterials.* 2005; 26 (24): 4903-11.

.

Chen QZ, Thompson ID, Boccaccini AR. 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006; 27 (11): 2414-25

Chen X, Zhao Y, Geng S, Miron RJ, Zhang Q, Wu C, Zhang Y. *In vivo* experimental study on bone regeneration in critical bone defects using PIB nanogels/boron-containing mesoporous bioactive glass composite scaffold. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10: 839-46. doi: 10.2147/IJN.S69001.

Deb S, Chana S. Biomaterials in Relation to Dentistry. *Front Oral Biol.* 2015; 17: 1-12.. doi: 10.1159/000381686.

Deliormanli AM. Size-dependent degradation and bioactivity of borate bioactive glass. *Ceramics International,* 2013; 39 (7): 8087-8095.

Doostmohammadi A, Monshi A., Salehi R., Fathi M.H., Seyedjafari E., Shafiee A., Soleimani M. Cytotoxicity evaluation of 63s bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite particles using human bone-marrow stem cells. *Biomed Pap Med FacUnivPalacky Olomouc Czech Repub.* 2011; 155 (4): 323-6, 2011. doi: 10.5507/bp.2011.028.

Dos Santos AA, Miranda CDO, Alves MTS, Faloppa F. O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. *Acta Ortop Bras.* 2005; 13 (4).

Elgayar I, Aliev AE, Boccaccini AR, Hill RG. Structural analysis of bioactive glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids.* 2005; 351: 173–183.

Fernandes GVO, Calasans-Maia M, Mitri FF, Bernardo VG, Rossi A, Almeida GDS, Granjeiro JM. Histomorphometric Analysis of Bone Repair in Critical Size Defect in Rats Calvaria Treated with Hydroxyapatite and Zinc-Containing Hydroxyapatite 5%. *Key Engineering Materials.* 2009; 396-398: 15- 18.

Ferrando A, Part J, Baeza J. Treatment of Cavitary Bone Defects in Chronic Osteomyelitis: Biogactive glass S53P4 vs. Calcium Sulphate Antibiotic Beads. *J Bone Jt Infect.* 2017; 2 (4): 194-201. doi: 10.7150/jbji.20404.

Florencio-Silva R, Sasso GRS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International.* 2015; 2015.

Fujibayashi S, Neo M, Kim H, Kokubo T, Nakamura T. A comparative study between *in vivo* bone ingrowth and *in vitro* apatite formation on Na<sub>2</sub>O–CaO–SiO<sub>2</sub> glasses. *Biomaterials.* 2003; 24: 1349–1356.

Gabbai-Armelin PR, Souza MT, Kido HW, Tim CR, Bossini PS, Magri AM, Fernandes KR, Pastor FA, Zanotto ED, Parizotto NA, Peitl O, Renno AC. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26(5): 177. doi: 10.1007/s10856-015-5516-1.

Gartner LP, Hiatt JL. Atlas Colorido de Histologia. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005; (Suppl 3): 20–7.

Golub EE. Role of Matrix Vesicles in Biomineralization. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790 (12): 1592–1598. doi:10.1016/j.bbagen.2009.09.006.

Gomes PS e Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory Animals*. 2011; 45: 14–24. doi: 10.1258/la.2010.010085.

Gorustovich AA, López JM, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biological performance of boron-modified bioactive glass particles implanted in rat tibia bone marrow. *Biomed Mater*. 2006; 1(3): 100-5. doi: 10.1088/1748-6041/1/3/002.

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2000; 106: 360–371.

Gosain AK, Santoro TD, Song LS, Capel CC, Sudhakar PV, Matloub HS. Osteogenesis in calvarial defects: contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 112(2): 515-27.

Grover V, Kapoor A, Malhotra R, Uppal RS. Evaluation of the efficacy of a bioactive synthetic graft material in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Indian Soc Periodontol*. 2013; 17 (1): 104-10. doi: 10.4103/0972-124X.107484.

Han X, Day DE. Reaction of sodium calcium borate glasses to form hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007; 18 (9): 1837-1847.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003; 423 (6937): 349-55.

Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *J. Biomed. Mater. Res. Symposium*. 1971; 2 (Part 1): 117- 141.

Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*. 1991; 74 (7): 1487-1510.

Hench LL, Polak JM. Third-Generation Biomedical Materials. *Science*. 2002; 195: 1014-1017.

Hench LL. The story of Bioglass®. *J. Mater. Sci: Mat Med*. 2006; 17: 967–978.

Hench LL. Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications. *New Journal of Glass and Ceramics*. 2013; 3: 67-73.

Hoppe A, Meszaros R, Stähli C, Romeis S, Schmidt J, Peukert W, Marelli B, Nazhat SN, Wondraczek L, Lao J, Jallot E, Boccaccini AR. *In vitro* reactivity of Cu doped 45S5 Bioglass® derived scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013; 1 (41): 5659-5674.

Huang W, Rahaman MN, Day DE, Li Y. Mechanisms for converting bioactive silicate, borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions. *Phys. Chem. Glasses: Eur. J. Glass Sci. Technol. B*. 2006; 47 (6).

Jensen SS, Aaboe M, Janner SF, Saulacic N, Bornstein MM, Bosshardt DD, Buser D. Influence of particle size of deproteinized bovine bone mineral on new bone formation and implant stability after simultaneous sinus floor elevation: a

histomorphometric study in minipigs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015; 17(2): 274-85. doi: 10.1111/cid.12101.

Jones JR, Sepulveda P, Hench LL. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2001; 58 (6): 720-726.

Jones JR, Tsigkou O, Coates EE, Stevens MM, Polak JM, Hench LL. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. *Biomaterials.* 2007; 28 (9): 1653-63.

Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 2015; 23 Suppl: 53-82. doi: 10.1016/j.actbio.2015.07.019.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus.* 2001; 10 (4).

Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 228 (1-2): 79-102.

Kaur G, Pandey OP, Singh K, Homa D, Scott B, Pickrell G. A review of bioactive glasses: their structure, properties, fabrication and apatite formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2014; 102 (1): 254-274.

Kavitha, RJ, Subha B, Shanmugam S, Ravichandra K. Synthesis and Invitro Characterisation of Lithium Doped Bioactive Glass through Quick Alkali Sol-Gel Method. *International Journal of Innovative Research in Science and Engineering.* 2014; 1(2): 2347-3207.

Kiran P, Ramakrishna V, Trebbin M, Udayashankar NK, Shashikala HD. Effective role of CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ratio on SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass system. J Adv Res. 2017; 8(3): 279-288. doi: 10.1016/j.jare.2017.02.001.

Kokubo, Tadashi; Takadama, Hiroaki. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?. Biomaterials. 2006; 27 (15): 2907-2915.

Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2002; 62 (4): 600-612.

Krishnan V, Lakshmi T. Bioglass: A novel biocompatible innovation. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research. 2013; 4 (2): 78-83. doi: 10.4103/2231-4040.111523.

Lakhkar NJ, Lee IH, Kim HW, Salih V, Wall IB, Knowles JC. Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: role and controlled delivery from phosphate-based glasses. Adv Drug Deliv Rev. 2013; 65 (4): 405-20. doi: 10.1016/j.addr.2012.05.015.

Lee EJ., Kasper FK., Mikos AG. Biomaterials for Tissue Engineering. Annals of Biomedical Engineering. 2014; 42 (2): 323–337.

Leite JG. Aplicação das técnicas de espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à preservação do patrimônio. 2008. 76f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade do Porto.

Leite DO, Prado RJ. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. Revista Brasileira de Ensino de Física. 2012; 34 (2).

Lima CJ, Castro da Silva II, Barros LFH, Granjeiro JM, Silva MHP. Resposta do tecido subcutâneo de camundongos à implantação de um novo biovidro à base de óxido de nióbio. Matéria (Rio J.). 2011; 16 (1): 574-582.

Lin Y Xiao W, Sonny Bal B, Rahaman MN. Effect of copper-doped silicate 13-93 bioactive glass scaffolds on the response of MC3T3-E1 cells *in vitro* and on bone regeneration and angiogenesis in rat calvarial defects *in vivo*. Mater SciEng C Mater Biol Appl. 2016; 67: 440-52. doi: 10.1016/j.msec.2016.05.073.

Liu X, Xie Z, Zhang C, Pan H, Rahaman MN, Zhang X, Fu Q, Huang W. Bioactive borate glass scaffolds: *in vitro* and *in vivo* evaluation for use as a drug delivery system in the treatment of bone infection. J Mater Sci Mater Med. 2010; 21 (2): 575-82. doi: 10.1007/s10856-009-3897-8.

Liu X, Rahaman MN, Day DE. Conversion of melt-derived microfibrinous borate (13-93B3) and silicate (45S5) bioactive glass in a simulated body fluid. J Mater Sci Mater Med. 2013; 24(3): 583-95. doi: 10.1007/s10856-012-4831-z.

Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. Open Dent J. 2014 ;8:56-65. doi: 10.2174/1874210601408010056.

Lucacel RC, Maier M, Simon V. Structural and *in vitro* characterization of TiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioglasses. Journal of Non-Crystalline Solids. 2010; 356 (5): 2869-2874.

Mačković M, Hoppe A, Detsch R, Mohn D, Stark WJ, Spiecker E, Boccaccini AR. Bioactive glass (type 45S5) nanoparticles: *in vitro* reactivity on nanoscale and biocompatibility. J. Nanopar Res. 2012; 14: 966.

Maiorana C, Andreoni D, Poli PP. Hard and Soft Tissue Management of a Localized Alveolar Ridge Atrophy with Autogenous Sources and Biomaterials: A Challenging Clinical Case. Case Rep Dent. 2016; 2016.

Manupriya, Thind KS, Sharma G, Singh K, Rajendran V, Aravindan S. Soluble borate glasses: *in vitro* analysis. J. Am. Ceram. Soc. 2007; 90 (2): 467-471.

Margha FH, Abdelghany AM. Bone bonding ability of some borate bio-glasses and their corresponding glass-ceramic derivatives. Processing and Application of Ceramics. 2012; 6 (4): 183-192.

Marion NW, Liang W, Reilly GC, Day DE, Rahaman MN, Mao JJ. Borate Glass Supports the *In Vitro* Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Mechanics of Advanced Materials and Structures*. 2005; 12:1–8.

Medeiros ARB. Uso de ATR/FTIR e FTNIR associado a técnicas quimiométricas para quantificação de aditivos em gasolina automotiva. 2009. 86f. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade de Brasília.

Mercier C, Follet-Houttemane C, Pardini A, Revel B. Influence of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> content on the structure of SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioglasses by <sup>29</sup>Si and <sup>31</sup>P MAS-NMR. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2011; 357: 3901–3909.

Mneimne M, Hill RG, Bushby AJ, Brauer DS. High phosphate content significantly increases apatite formation of fluoride-containing bioactive glasses. *Acta Biomater*. 2011; 7(4): 1827-34. doi: 10.1016/j.actbio.2010.11.037.

Mohini GJ, Baskaran GS, Kumar VR, Piasecki M, Veeraiiah N. Bioactivity studies on TiO<sub>2</sub>-bearing Na<sub>2</sub>O–CaO–SiO<sub>2</sub>–B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> glasses. *Materials Science and Engineering C*. 2015; 57: 240-248.

Naqvi A, Gopalakrishnan D, Martande S. Comparative Evaluation of Bioactive Glass Putty and Platelet Rich Fibrin in the Treatment of Human Periodontal Intrabony Defects: A Randomized Control Trial. *J Clin Diagn Res*. 2017; 11 (7): ZC09–ZC13.

Ning J, Yao A, Wang D, Huang W, Fu H, Liu X, Jiang X, Zhang X. Synthesis and *in vitro* bioactivity of a borate-based bioglass. *Mater Lett*. 2007; 61(30): 5223-5226.

O'Donnell MD, Watts SJ, Hill RG, Law RV. The effect of phosphate content on the bioactivity of soda-lime-phosphosilicate glasses. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20 (8): 1611-8. doi: 10.1007/s10856-009-3732-2.

Oudadesse H, Bui XV, Yann LG, Mostafa A, Cathelineau G. Chitosan effects on bioactive glass for application as biocomposite biomaterial. *Int J of biolo and biomed engi.* 2011; 5: 49-56.

Ouis MA, Abdelghany AM, Elbatal HA. Corrosion mechanism and bioactivity of borate glasses analogue to Hench's bioglass. *Processing and Application of Ceramics.* 2012; 6 (3): 141-149.

Pan Z, Jiang P, Xue S, Wang T, Li H, Wang J. Repair of a critical-size segmental rabbit femur defect using bioglass- $\beta$ -TCP monoblock, a vascularized periosteal flap and BMP-2. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017. doi: 10.1002/jbm.b.34018.

Pascuta P, Lungu R, Ardelean I. FTIR and Raman spectroscopic investigation of some strontium–borate glasses doped with iron ions. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics.* 2010; 21 (6): 548-553.

Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quim. Nova.* 2015; 38 (7): 957-971.

Poh PSP, Hutmacher DW, Holzapfel BM, Solanki AK, Stevens MM, Woodruff MA. *In vitro* and *in vivo* bone formation potential of surface calcium phosphate-coated polycaprolactone and polycaprolactone/bioactive glass composite scaffolds. *Acta Biomater.* 2015; 30: 319-333. doi: 10.1016/j.actbio.2015.11.012.

Rahaman MN, Day DE, Bal BS, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, Tomsia AP. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater.* 2011; 7 (6): 2355-73. doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.016.

Sabet JM, Amoian B, Seyedmajidi M. Histological and histomorphometric evaluation of the synthetic biomaterial Natix® in horizontal reconstruction of alveolar ridge. *Dent Res J (Isfahan).* 2017; 14 (2): 97-103.

Salgado PC, Sathler PC, Castro HC, Alves GG, De Oliveira AM, De Oliveira RC, Maia MDC, Rodrigues CR, Coelho PG, Fuly A, Cabral LM, Granjeiro JM. Bone Remodeling, Biomaterials and Technological Applications: Revisiting Basic Concepts. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2011; 2: 318-328. doi:10.4236/jbnb.2011.23039.

Samudrala R, Azeem AP, Penugurti V, Manavathi B. Cytocompatibility studies of titania-doped calcium borosilicate bioactive glasses in-vitro. *Materials Science and Engineering: C*. 2017; 77: 772-779.

Saravanapavan P, Jones JR, Pryce RS, Hench LL. Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO<sub>2</sub> system: A comparison with ternary (CaO-P<sub>2</sub>P<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>) and quaternary glasses (SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003; 66 (1): 110-119.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986; 205: 299-308.

Schwartz Z, Doukarsky-Marx T, Nasatzky E, Goultchin J, Ranly DM, Greenspan DC, Sela J, Boyan BD. Differential effects of bone graft substitutes on regeneration of bone marrow. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19 (12): 1233-45. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01582.x.

Sheikh Z, Abdallah MN, Hanafi AA, Misbahuddin S, Rashid H, Glogauer M. Mechanisms of *in Vivo* Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials. *Materials (Basel)*. 2015; 8(11): 7913-7925. doi: 10.3390/ma8115430.

Skipper LJ, Sowrey FE, Pickup DM, Fitzgerald V, Rashid R, Drake KO, Lin Z, Saravanapavan P, Hench LL, Smith ME, Newport RJ. Structural studies of bioactivity in sol-gel-derived glasses by X-ray spectroscopy. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 70 (2): 354-60.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012; 7(10): 1918-29. doi: 10.1038/nprot.2012.113

Szpalski C, Barr J, Wetterau M, Saadeh PB, Warren SM. Cranial bone defects: current and future strategies. *Neurosurg Focus.* 2010; 29 (6): E8. doi: 10.3171/2010.9.

Tamjid E, Bagheri R, Vossoughi M, Simchi A. Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites. *Materials Science and Engineering C.* 2011; 31: 1526–1533.

Tilocca A, Cormack AN. Structural Effects of Phosphorus Inclusion in Bioactive Silicate Glasses. *J. Phys. Chem. B.* 2007; 111: 14256-14264.

Tiomis AC, Borges APB, Daibert APF, Duarte TS, Pontes KCS. Avaliação histológica do biovidro particulado na reparação de defeito experimental em mandíbula de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2010; 62 (1): 80-85.

Titorencu I, Pruna V, Jinga VV, Simionescu M. Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview. *Cell Tissue Res.* 2014; 355 (1): 23-33. doi: 10.1007/s00441-013-1750-3.

Uthgenannt BA, Kramer MH, Hwu JÁ, Wopenka B, Silva MJ. Skeletal Self-Repair: Stress Fracture Healing by Rapid Formation and Densification of Woven Bone. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(10): 1548–1556.

Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 25(8): 879-93. doi: 10.1111/clr.12194.

Vallet-Regí M, Romero AM, Ragel CV, LeGeros RZ. XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of *in vitro* growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 1999; 44 (4): 416-421.

Vogel M, Voigt C, Knabe C, Radlanski RJ, Gross UM, Müller-Mai CM. Development of multinuclear giant cells during the degradation of Bioglass particles in rabbits. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 70(3): 370-9.

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 276 (2): 461-5.

Wang H, Zhao S, Zhou J, Shen Y, Huang W, Zhang C, Rahaman MN, Wang D. Evaluation of borate bioactive glass scaffolds as a controlled delivery system for copper ions in stimulating osteogenesis and angiogenesis in bone healing. *J. Mater. Chem. B*. 2014.

Weinand WR. Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e a sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis. 2009. 211f. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2009.

Wheeler DL, Stokes KE, Hoellrich RG, Chamberland DL, McLoughlin SW. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *J Biomed Mater Res*. 1998; 41 (4): 527-33.

Yang C, Unursaikhan O, Lee JS, Jung UW, Kim CS, Choi SH. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014; 102 (1): 80-8. doi: 10.1002/jbm.b.32984.

Yang Q, Chen S, Shi H, Xiao H, Ma Y. *In vitro* study of improved wound-healing effect of bioactive borate-based glass nano-/micro-fibers. *Materials Science and Engineering C*. 2015; 55: 105-117.

Yao A, Wang D, Huang W, Fu Q, Rahaman MN, Day DE. *In vitro* bioactive characteristics of borate-based glasses with controllable degradation behavior. *Journal of the American Ceramic Society*. 2007; 90 (1): 303-306.

Zahid S, Shah AT, Jamal A, Chaudhry AA, Khan AS, Khan AF, Muhammad N, Rehman I. Biological behavior of bioactive glasses and their Composites. *RSC Adv*. 2016; 74.

Zhang J, Guan J, Zhang C, Wang H, Huang W, Guo S, Niu X, Xie Z, Wang Y. Bioactive borate glass promotes the repair of radius segmental bone defects by enhancing the osteogenic differentiation of BMSCs. *Biomed. Mater*. 2015; 10.