

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Ana Maria Barbosa

**Blendas de cimento de aluminato de cálcio contendo vidro bioativo e estrôncio
para aplicações como biomaterial**

São José dos Campos, SP

2022

ANA MARIA BARBOSA

**BLENDAS DE CIMENTO DE ALUMINATO DE CÁLCIO CONTENDO VIDRO
BIOATIVO E ESTRÔNCIO PARA APLICAÇÕES COMO BIOMATERIAL**

Tese apresentada no programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de doutor em Engenharia Biomédica

Orientadora: Prof^a. Dra. Ivone Regina de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero

São José dos Campos, SP

2022

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Barbosa, Ana Maria

Blendas de cimento de aluminato de cálcio contendo vidro bioativo e estrôncio para aplicações como biomaterial / Ana Maria Barbosa; orientadora, Ivone Regina de Oliveira; co-orientador Leandro José Raniero. - São José dos Campos, SP, 2022.

1 CD-ROM, 102 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. cimento de aluminato de cálcio. 3. vidro bioativo. 4. bioatividade. 5. testes in vitro. I. Oliveira, Ivone Regina de , orient. II. Raniero, Leandro José , co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Ana Maria Barbosa, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 12 de Maio de 2022.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 11 / 03 / 2022

ANA MARIA BARBOSA

**“BLENDAS DE CIMENTO DE ALUMINATO DE CÁLCIO CONTENDO VIDRO BIOATIVO
E ESTRÔNCIO PARA APLICAÇÕES COMO BIOMATERIAL.”**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^ª DR.^ª LUCIANA DE BARROS SANT'ANNA



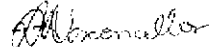
PROF.^ª DR.^ª IVONE REGINA DE OLIVEIRA



PROF. DR. LEANDRO JOSÉ RANIERO



PROF.^ª DR.^ª LUANA MAROTTA DE VASCONCELLOS -UNESP



PROF.^ª DR.^ª LARISSA MOREIRA SPINOLA DE CASTRO RAUCCI -Unaerp



Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 11 de março 2022.

À Da. Leontina Mariano de Pontes (in memoriam) que permitiu, com a generosidade do seu enorme coração, a transformação da minha vida.

Ao Pedro Augusto, meu filho, meu amigo e minha Luz nesse mundo.

AGRADECIMENTOS

Gratidão à Deus, em todas as horas, pela vida, saúde e oportunidades.

À Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira, minha orientadora: uma pessoa generosa que, com seu enorme coração e entusiasmo, me ofereceu a oportunidade de trabalhar a seu lado. Gratidão pela sua paciência, incentivo e, especialmente, pela amizade que construímos nesses quatro anos.

Ao Prof. Dr. Leandro José Raniero, meu Coorientador, por toda contribuição durante o desenvolvimento deste estudo.

Aos amigos Engenheiro Kennedy Wallace dos Santos e à graduanda, em Engenharia Biomédica, Isabela Gonçalves por tudo que contribuíram para a realização desse trabalho, pelos almoços divertidos, café, risadas e companheirismo.

À toda equipe do Laboratório de Cerâmicas Avançadas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP, pela ajuda, incentivo e contribuições.

À Profa. Dr. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, uma pessoa dinâmica e apaixonada pelo seu trabalho e, ao seu aluno Hugo Gutemberg Patino de Oliveira Filho, pelos ensaios *in vivo*, e toda contribuição que deram a este estudo.

À Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola Castro Raucci e toda sua equipe, pelos testes de viabilidade celular.

À minha família pela paciência, compreensão e incentivo durante a realização desse trabalho, especialmente ao meu filho Pedro Augusto.

À minha amiga Profa. Dra. Heidi Korzenowski pelo incentivo e torcida para que essa etapa fosse cumprida. Nesses quatorze anos de amizade, sua ajuda nunca me faltou.

Aos funcionários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP.

À Fundação Valeparaibana de Ensino/Universidade do Vale do Paraíba pela bolsa concedida para a realização do doutorado.

Ao final dessa intensa jornada, posso dizer que cresci, melhorei intelectual e emocionalmente graças à ajuda das pessoas com quem convivi. Há muitas pessoas para agradecer. Pessoas que, de diferentes maneiras, ofereceram atenção, tempo e contribuição para que este trabalho pudesse ser construído. A todos, minha eterna gratidão.

“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará...

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum,
porque Tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.”

RESUMO

Neste trabalho foram produzidas blendas à base de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo vidro bioativo (BG58S) em diferentes teores (5, 7,5 e 10% em peso) e óxido de estrôncio (SrO 1% em peso) visando melhorar sua bioatividade e a capacidade de estimular a regeneração óssea. Primeiramente, o vidro bioativo 58S (BG58S) foi sintetizado em diversas condições e caracterizado quanto à composição química, distribuição de tamanho de partícula e cristalinidade. A amostra de BG58S selecionada após as caracterizações anteriormente mencionadas foi utilizada para a produção de blendas com cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) e vidro bioativo (BG58S) em diferentes teores (5, 7,5 e 10% em peso) e foram caracterizadas quanto à densidade teórica, microdureza, resistência à compressão uniaxial após tratamento em solução simuladora de fluido corporal (SBF), porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros antes e após o tratamento com SBF. A adição de 7,5% em peso de BG58S no cimento homogêneo de aluminato de cálcio (CH) melhorou suas propriedades mecânicas como microdureza e resistência à compressão uniaxial. Na sequência, um novo conjunto de amostras formadas por cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo vidro bioativo (BG58S) com diferentes teores (5, 7,5 e 10% em peso) e óxido de estrôncio (SrO 1% em peso) foram produzidas para os testes de bioatividade e biológicos (*in vitro* e *in vivo*). As blendas foram mais bioativas devido à presença de uma fase amorfa altamente solúvel, conforme confirmado por meio de SEM/EDS principalmente para 7,5% em peso de BG58S sem e com SrO a partir de 1 dia em SBF. As análises de FTIR indicaram a formação da fase apatita por meio do aumento da intensidade das bandas associadas ao grupo PO_4^{3-} após o tratamento com SBF. Com relação aos testes *in vitro*, todas as blendas permitiram o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico e a formação de matriz mineralizada aumentou devido à inclusão de BG58S e SrO promovendo o processo de osteogênese. Ensaios de viscosidade, injetabilidade e trabalhabilidade de suspensões contendo 73, 74 e 75 % de teor sólidos foram realizados e mostraram que aumento da viscosidade está relacionado à diminuição da injetabilidade, conforme há aumento no teor sólido das suspensões. Os testes *in vivo* indicaram a neoformação óssea na interface com os diferentes materiais empregados, sendo que o tecido formado exibiu aspecto de normalidade. Na análise histológica descritiva foram observados os aspectos do processo de reparação óssea, verificando-se que a neoformação óssea e o arranjo das trabéculas ósseas imaturas preencheram os defeitos ósseos criados para o teste. A presença de linhas reversas observada, é um indicativo da atividade de remodelação óssea. A análise histomorfométrica realizada utilizando imagens de cortes histológicos realizados na área do defeito ósseo na qual houve a inserção do biomaterial, revelou que a neoformação óssea foi maior no defeito ósseo preenchido com CH/7,5%p BG58S e 1%-p de SrO. Conclui-se, com bases nos resultados obtidos neste trabalho, que a blenda CH/7,5%p BG58S e 1%-p de SrO seja a mais promissora para ser utilizada em reparo ósseo.

Palavras-chave: cimento de aluminato de cálcio; vidro bioativo; estrôncio; bioatividade; testes *in vitro*; testes *in vivo*.

CALCIUM ALUMINATE CEMENT BLENDS CONTAINING BIOACTIVE GLASS AND STRONTIUM FOR APPLICATIONS AS BIOMATERIAL FOR BONE REPAIR

ABSTRACT

In this work, homogeneous calcium aluminate (CH) cement-based blends containing bioactive glass (BG58S) at different levels (5, 7.5 and 10% by weight) and strontium oxide (SrO 1% by weight) were produced. to improve its bioactivity and ability to stimulate bone regeneration. In the first part of the work, bioactive glass 58S (BG58S) was synthesized under different conditions and characterized in terms of chemical composition, particle size distribution and crystallinity. The sample of BG58S selected after the characterizations was used to produce blends with homogeneous calcium aluminate cement (CH) and bioactive glass (BG58S) in different contents (5, 7.5 and 10% by weight) and were characterized as to theoretical density, microhardness, uniaxial compressive strength after treatment in body fluid simulating solution (SBF), apparent porosity and pore size distribution before and after treatment with SBF. The addition of 7.5% by weight of BG58S in the homogeneous calcium aluminate (CH) cement improved its mechanical properties such as microhardness and uniaxial compressive strength. In the second part, a new set of samples formed by homogeneous calcium aluminate cement (CH) containing bioactive glass (BG58S) with different contents (5, 7.5 and 10% by weight) and strontium oxide (SrO 1% by weight). weight) were produced for bioactivity and biological tests (in vitro and in vivo). The blends were more bioactive due to the presence of a highly soluble amorphous phase, as confirmed by SEM/EDS mainly for 7.5% by weight of BG58S without and with SrO from 1 day in SBF. FTIR analyzes indicated the formation of the apatite phase through the increase in the intensity of the bands associated with the PO₄³⁻ group after treatment with SBF. Regarding the in vitro tests, all blends allowed the development of the osteoblastic phenotype and the formation of mineralized matrix increased due to the inclusion of BG58S and SrO promoting the osteogenesis process. Viscosity, injectability and workability tests of suspensions containing 73, 74 and 75% solids content were carried out and showed that an increase in viscosity is related to a decrease in injectability, as there is an increase in the solid content of the suspensions. The in vivo tests indicated bone neoformation at the interface with the different materials used, and the tissue formed showed an aspect of normality. In the descriptive histological analysis, aspects of bone repair development were observed, verifying that bone neoformation and the arrangement of immature bone trabeculae filled in the gaps. The presence of reverse lines observed is indicative of bone remodeling activity. The histomorphometric analysis performed using images of histological sections performed in the bone defect in which the biomaterial was inserted, revealed that bone neoformation was greater in the bone defect filled with CH/7.5 wt% BG58S and 1 wt% SrO. It is concluded, based on the results obtained in this work, that the blend CH/7,5wt%58S and 1% SrO in the most promising to be used in bone repair

Keywords: calcium aluminate cement; Bioactive glass; Strontium; Bioactivity; In vitro tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Estrutura de um osso longo.	21
Figura 2 - Estrutura do osso compacto e esponjoso.	22
Figura 3 - Representação simplificada da estrutura de um osso longo: a) magnificação do osso esponjoso; b) magnificação da secção; c) secção transversal do osso; d) magnificação da estrutura do osso esponjoso.....	23
Figura 4 – Células ósseas.	24
Figura 5 – Esquema da disposição das células no osso.....	26
Figura 6 – Esquema ilustrativo da remodelação óssea.....	28
Figura 7 - Diagrama ternário do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$, com as regiões de formação de ligação entre material e tecidos. Composições da região A apresentam 6% em peso de P_2O_5	36
Figura 8 – Composições de bioatividade dos vidros produzidos via sol-gel em relação aos vidros produzidos por fundição.....	39
Figura 9 – Visão geral da metodologia empregada para o desenvolvimento do trabalho.	46
Figura 10 – Etapas da síntese do vidro bioativo de acordo com as condições da Tabela 4.	48
Figura 11– Procedimento cirúrgico: A) mesa cirúrgica; B) tricotomia da região; C) incisão; D) fêmur direito exposto com os tecidos divulsionados; E) defeito ósseo confeccionado; F) cimento preparado; G) injetabilidade do cimento no defeito ósseo; H) Tecidos reposicionados e suturados.....	61
Figura 12– Análise da distribuição de tamanho de partículas para os pós de vidro bioativo 58S produzidos de acordo com as condições da Tabela 4.....	64
Figura 13 – Difratogramas de raios X dos pós de vidro bioativo 58S sintetizados empregando (a) ácido fosfórico (AF) ou (b) trietilfosfato (TEP) como precursor de fósforo (P).	65
Figura 14- (a) Densidade teórica ou real; (b) microdureza; (c) resistência à compressão uniaxial depois do tratamento com SBF e (d) porosidade aparente antes e depois do tratamento com SBF para as blendas formadas pelo CH e diferentes porcentagens de BG.	67
Figura 15- Distribuição de tamanho de poros (a) sem e (b) com tratamento com SBF para blendas formadas com cimento de aluminato de cálcio (CH) com diferentes quantidades de vidro bioativo (BG).	69
Figura 16- Viscosidade das suspensões de CH com a adição de 5%, 7,5% e 10%-p de BG58S contendo 73, 74 e 75 %-p de teor sólido, avaliados a uma taxa de cisalhamento de 50s^{-1}	70
Figura 17- Injetabilidade das suspensões de CH com a adição de 5%, 7,5% e 10% de BG58S a 73, 74 e 75 % p de teor sólido.	71
Figura 18- (a) Trabalhabilidade das suspensões de CH-BG com 74 % de teor sólido avaliado por teste oscilatório ($G' \times \text{tempo}$).	71
Figura 19 - Micrografias eletrônicas de varredura para as blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG), sem ou com tratamento em SBF por 1, 7 e 15 dias. As fraturas nas camadas recém-formadas foram causadas pelo processo de secagem das amostras.	73
Figura 20 - Micrografias SEM para as blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes quantidades de vidro bioativo (BG58S) e 1%p de óxido de estrôncio (SrO) sem ou com tratamento em SBF por 1, 7 e 15 dias. As fraturas nas camadas recém-formadas foram causadas pelo processo de secagem das amostras.	75
Figura 21 - Espectros FTIR para as blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) (a) CH-5%BG58S; (b) CH-7,5%BG58S (c) CH-10%BG58S e (d) CH-5%BG58S 1 %-p SrO (e) CH-7,5%BG58S 1 %-p de SrO, e (f) CH-10%BG58S e 1 %-p SrO sem e com tratamento em SBF por 1, 7 and 15 dias.	77

Figura 22 - Difratogramas XRD para as blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes porcentagens de vidro bioativo (BG) sem e com 1 %-p de estrôncio (Sr) após tratamento em SBF por 1 e 15 dias.....	79
Figura 23 - Viabilidade celular em cultura de células pré-osteoblásticas expostas aos extratos das blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) e estrôncio (Sr) em concentrações de 12.5%, 25% and 50% e na ausência (controle) por 3 dias. As marcações em verde indicam viabilidade celular e as em vermelho, indicam células mortas. Barra de escala=200 µm.	81
Figura 24 - Teste de viabilidade celular (MTT) em culturas de células pré-osteoblásticas expostas aos extratos das composições de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) e estrôncio (Sr) em concentrações de 12,5%, 25% e 50% e na sua ausência (controle) for 48 e 72 horas. As letras diferentes para as amostras (50%, 72 h) indicam diferenças significativas entre os grupos na mesma concentração (Kruskal Wallis/SNK, p<0.05). Para todos os outros resultados não houve diferença estatística.	83
Figura 25 - Atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) em cultura de células pre-osteoblásticas expostas aos extratos das composições de cimento de aluminato de cálcio (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) e estrôncio (Sr) em concentrações de 12,5%, 25% e 50% e na sua ausência (controle) após 7 dias. Barra de escala = 200 µm.	85
Figura 26- Aspectos macroscópicos da marcação com alizarina em culturas osteoblásticas de MC3T3-E1 expostas aos extratos das composições de cimento de aluminato de cálcio (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) e estrôncio (Sr) em concentrações de 12,5%, 25% and 50% e em sua ausência (controle) após 14 dias. Barra da escala = 200 µm.	86
Figura 27 - Quantificação bioquímica da mineralização em culturas de células osteoblásticas MC3T3-E1 expostas aos extratos das composições de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) e estrôncio (Sr) em concentrações de 12,5%, 25% and 50% após 14 dias. As letras diferentes entre as amostras indicam uma diferença significativa entre os grupos de mesma concentração (Kruskal Wallis / SNK, p <0.05).	87
Figura 28– Fotomicrografia em MO observada no grupo CH-7,5BG ampliado 2,5x. Detalhe da figura anterior da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (★), tecido ósseo neoformado () e tecido ósseo pré-existente (▲).	89
Figura 29– Fotomicrografia em MO observada no grupo CH-7.5BG ampliado 10x. Detalhe da figura anterior da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (), tecido ósseo neoformado (➡) e tecido ósseo pré-existente (▲).	89
Figura 30 – Fotomicrografia em MO observada no grupo CH-7.5BG/Sr ampliado 2,5x. Fotomicrografia em microscópio óptico da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (), tecido ósseo neoformado (➡) e tecido ósseo pré-existente (▲).	90
Figura 31 - Fotomicrografia em MO observada no grupo CH-7.5BG/Sr ampliado 10x. Fotomicrografia em microscópio óptico, detalhe da Figura 30 da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (), tecido ósseo neoformado (➡) e tecido ósseo pré-existente (▲).	90
Figura 32- Fotomicrografia em MO observada no grupo CH ampliada 2,5x. Fotomicrografia em microscópio óptico da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (), tecido ósseo neoformado (➡) e tecido ósseo pré-existente (▲).	91
Figura 33 - Fotomicrografia em MO observada no grupo CH ampliada 10x. Fotomicrografia em microscópio óptico, detalhe da figura anterior da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (), tecido ósseo neoformado (➡) e tecido ósseo pré-existente ().	91

Figura 34 – Gráfico de médias e desvio padrão (\pm) dos dados obtidos da neoformação óssea (%) na interface com os biomateriais CH, CH-7.5BG e CH-7.5BG/Sr. 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índice de Envelhecimento (IE) para o Mundo e o Brasil: 1950-2100	15
Tabela 2 - Relação entre o tipo de material do implante e a resposta do tecido.	31
Tabela 3 - Principais produtos de dissolução iônica liberados de vidros bioativos e seus efeitos terapêuticos (ABUKAWA, 2006).	42
Tabela 4 - Informações técnicas dos reagentes utilizados para a síntese do BG58S.	47
Tabela 5 - Condições das diversas sínteses realizadas para obtenção do vidro bioativo BG58S.	50
Tabela 6 -Reagentes usados na preparação de um litro de solução de fluido corporal.....	54
Tabela 7 – Composição química (análise EDS) dos vidros bioativos 58S sintetizados variando algumas condições do processo sol-gel.....	66
Tabela 8 - Análises EDS para as superfícies das blendas antes e depois do tratamento com SBF por 1, 7 e 15 dias.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAC	Cimento de aluminato de cálcio
CH	Cimento de aluminato de cálcio homogêneo
BG	Vidro bioativo
SBF	Fluido Simulado Corporal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 O osso	20
<i>3.1.1 A composição química do osso</i>	20
<i>3.1.2 A estrutura do osso e suas células</i>	20
<i>3.1.3 Propriedades biomecânicas do osso</i>	26
<i>3.1.4 A remodelação óssea</i>	27
3.2 Biomateriais	29
<i>3.2.1 Cimento de Aluminato de Cálcio</i>	33
<i>3.2.2 O vidro bioativo</i>	35
<i>3.2.3 O papel biológico dos elementos dopantes</i>	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Síntese do vidro bioativo – BG58S	46
4.2 Caracterização do vidro bioativo	50
<i>4.2.1 Distribuição de tamanho de partículas</i>	50
<i>4.2.2 Difração de raios X</i>	50
<i>4.2.3 Composição química</i>	50
4.3 Preparação das blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) e vidro bioativo (BG58S) sem e com óxido de estrôncio (SrO)	51
<i>4.3.1 Blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) e vidro bioativo (BG58S) sem óxido de estrôncio (SrO)</i>	51
<i>4.3.2 Blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH), vidro bioativo (BG58S) com óxido de estrôncio (SrO)</i>	52
4.4 Caracterização das blendas de CH-BG58S sem e com óxido de estrôncio (SrO)	52
<i>4.4.1 Caracterização das blendas de CH-BG58S sem óxido de estrôncio (SrO)</i>	52
<i>4.4.1.1 Densidade teórica ou real das amostras</i>	52
<i>4.4.1.2 Microdureza</i>	53
<i>4.4.1.3 Resistência mecânica à compressão uniaxial</i>	53
<i>4.4.1.4 Porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros</i>	55
<i>4.4.1.5 Viscosidade, trabalhabilidade e injetabilidade</i>	55
<i>4.4.1.6 Bioatividade</i>	56
<i>4.4.2 Caracterização das blendas de CH-BG58S com óxido de estrôncio (SrO)</i>	57
<i>4.4.2.1 Cultivo celular</i>	57
<i>4.4.2.2 Testes de cultura celular</i>	57
<i>4.4.2.3 Avaliação de neoformação óssea</i>	59
<i>4.4.2.3.1 Procedimento cirúrgico</i>	59
<i>4.4.2.3.2 Análise histológica e histomorfométrica</i>	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
5.1 Vidro bioativo BG58S	63
5.2 Blendas de CH e BG58S sem óxido de estrôncio (SrO)	66
5.3 Blendas de CH e BG58S com 1%-p de óxido de estrôncio (SrO)	72
6 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

As projeções demográficas divulgadas pela Divisão de População da ONU (UNITED NATIONS, 2019) mostram que o processo de envelhecimento da população no mundo caminha a passos largos e, no caso do Brasil, esse processo é ainda muito mais acelerado. A Tabela 1, apresenta o Índice de Envelhecimento (IE) para o mundo e para o Brasil, entre 1950 e 2100, para três categorias de idosos: 60 anos e mais, 65 anos e mais e 80 anos e mais de idade.

Tabela 1: Índice de Envelhecimento (IE) para o Mundo e o Brasil: 1950-2100

Anos	Mundo			Brasil		
	IE 60 e +	IE 65 e +	IE 80 e +	IE 60 e +	IE 65 e +	IE 80 e +
1950	23,2	14,8	1,6	11,7	7,2	0,7
2000	33,0	22,8	3,9	26,5	17,5	2,7
2020	52,9	36,7	7,3	67,8	46,3	9,4
2050	101,2	75,3	20,7	203,2	157,0	46,4
2100	161,7	129,4	46,4	308,8	262,5	120,3

Fonte: Adaptado de United Nations, 2019.

Considerando os dados apresentados na Tabela 1, pode-se afirmar que o envelhecimento já faz parte da maioria das sociedades e, com o avanço da idade, é natural que nem todas as partes do corpo possam manter suas funções à medida que o processo de envelhecimento ocorre e, dentre essas partes, destaca-se o osso.

O osso, como o principal tecido estrutural do corpo humano, fornece suporte e proteção de vários órgãos, regula o pH do sangue, aloja a medula óssea que é o tecido que produz células sanguíneas e fornece os microambientes para várias células progenitoras (hematopoiéticas e mesenquimais) (KANE; MA, 2013; RIDDLE; CLEMENS, 2018).

Além do processo de envelhecimento, distúrbios relacionados ao osso podem levar à perda óssea e, muitas vezes, são causados por doenças inflamatórias, traumas, tumores ou doenças degenerativas. A principal questão de saúde é a melhoria da qualidade de vida da população, o que é bastante desafiador para a engenharia de tecidos. Na verdade, esta área tem como objetivo estudar e criar biomateriais que possam auxiliar no processo de regeneração

óssea, envolvendo pesquisas em ciências da saúde e engenharia de biomateriais (ASLAKOOHI *et al.*, 2019; VASCONCELLOS *et al.*, 2020).

Os biomateriais utilizados para a realização do reparo ósseo devem ter propriedades semelhantes às propriedades reais do osso, pois por ser uma estrutura rígida possui funções de grande importância, como proteger e sustentar os órgãos presentes no corpo e facilitar a locomoção (ASLANKOOHI *et al.*, 2019; VASCONCELLOS *et al.*, 2020; WANG; YEUNG, 2017). Além disso, o biomaterial a ser implantado deve ser biocompatível (RAUT *et al.*, 2020).

Dentre os biomateriais mais estudados com potencial para a reparação óssea, o cimento de aluminato de cálcio (CAC) tem se destacado por suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas (VICUNA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Este material apresenta características únicas de cura, endurecimento, microestrutura relacionada (VASCONCELLOS *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020; HERMANSSON, 2011) e coeficiente de expansão térmica que são muito semelhantes ao do osso humano (LOOF, 2008; KOPANDA; MACZURA, 1990). Além disso, o CAC desenvolve uma resistência mecânica apreciável à temperatura ambiente e tem mostrado melhorar suas propriedades biológicas quando combinado com outros compostos como a hidroxiapatita, por exemplo (OLIVEIRA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Embora o CAC seja confiável para aplicações biomédicas, outro material que se destaca entre as principais biocerâmicas, é o vidro bioativo (BG) (RAVARIAN *et al.*, 2010; BALAMURUGAN *et al.*, 2007). O BG representa um dos materiais de reparo ósseo mais promissores, devido à sua excelente biocompatibilidade, osteoindutividade, bioatividade, maior quantidade de cálcio e fósforo em sua composição química em relação ao vidro comum e também capacidade bactericida (TENGJIAO *et al.*, 2017; VERGNOL *et al.*, 2016; GHANNAM *et al.*, 2017). Além disso, possui a capacidade de se ligar quimicamente aos tecidos ósseos, formando uma camada de apatita em sua superfície, quando exposto a fluidos fisiológicos, exibindo excelente bioatividade, o que pode ser explicado pela semelhança entre a composição e a estrutura dos materiais bioativos com a fase mineral do osso.

O pó de vidro bioativo (BG) pode ser utilizado em diversas aplicações médicas e odontológicas, acelerando a regeneração de tecidos lesados do corpo humano, como fraturas ósseas, feridas na pele, problemas na cartilagem, esmalte, e dentina dos dentes, e até nervos. Por outro lado, as desvantagens do vidro bioativo são sua baixa tenacidade à fratura e resistência mecânica (REZAEI *et al.*, 2014). Assim, a confiabilidade mecânica do vidro bioativo puro não é suficiente, principalmente em ambientes úmidos, pois não pode ser utilizado como implante que requeira aplicação de alta carga, como por exemplo dentes ou ossos.

Entre muitas composições do sistema ternário $\text{SiO}_2\text{--CaO--P}_2\text{O}_5$, o gel-BG 58S (58 SiO_2 , 33 CaO , 9 P_2O_5 , % em peso ou 60 SiO_2 , 36 CaO , 4 P_2O_5 , mol%) é indicado na literatura (ZHONG, 2000; BUI *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2018; BAKHTIARI *et al.*, 2020) para aplicações como enxerto ósseo devido às suas (ZHONG, 2000) propriedades. Esta composição apresenta uma grande área superficial específica promovendo a formação de apatita em sua superfície em experimentos *in vitro*, o que a considera como bioatividade *in vivo* (BUI *et al.*, 2019; MOGHANIAN, 2018). O vidro bioativo 58S apresentou boa resistência mecânica, excelente atividade na formação de apatita e alta biocompatibilidade. É um vidro biodegradável e muito bioativo que possui a capacidade de união óssea demonstrando seu uso promissor na reparação de defeitos ósseos (CHEN *et al.*, 2018, ZHANG; VAN LE, 2020). A composição 58S tem uma pequena cristalinidade, uma alta taxa de formação de apatita em comparação com outras composições e apresenta degradação significativa com uma liberação correspondente de sílica solúvel e altas taxas de reabsorção (BALAMURUGAN *et al.*, 2006; SEPULVEDA, 2002; LI *et al.*, 2020). Com a liberação de íons cálcio, silício e fósforo, a expressão gênica e a proliferação de osteoblastos passam a formar o osso rapidamente (ZHANG; VAN LE, 2020).

Outro fator bioativo que tem sido estudado para estimular a regeneração do tecido lesado é o estrôncio (Sr), sugerindo que baixas doses de sais ou óxido de estrôncio estimulam a formação óssea. Esse metal é muito semelhante ao cálcio nos aspectos físico-químicos e biológicos, além de não apresentar níveis de toxicidade à saúde humana. Sua principal via de bioacumulação é a fase mineralizada do osso, preferencialmente no osso cortical. (USUDA *et al.*, 2007; QUERIDO *et al.*, 2016).

Além disso, muitas investigações mostram que a incorporação de aditivos elementares como Zn, Ag, Zr, Cu, Mg e Sr no sistema $\text{SiO}_2\text{--CaO--P}_2\text{O}_5$ melhora o desempenho dos BGs e introduz osteocondutividade, angiogenicidade e propriedades antibacterianas (GOUDARZI *et al.*, 2019; SHARIFIANJAZI, 2019). Dentre eles, o estrôncio (Sr) é o mais atrativo para melhorar as atividades osteogênicas e tem um papel importante no aumento da densidade óssea reduzindo o risco de fraturas no corpo humano. A incorporação de estrôncio em formulações de BGs levou a efeitos terapêuticos mais encorajadores em comparação com os não dopados e melhorou sua capacidade de regeneração óssea, sendo uma opção de cura segura para substituir dentes perdidos, implantes orais, por exemplo [3,8,21]. A adição de baixas doses de sais de estrôncio tem estimulado a formação óssea por atuar na atividade metabólica dos osteoblastos e também tem efeito anti-inflamatório (MOGHANIAN, 2018; ZHANG, 2020). O Sr apresenta aspecto inibitório no comportamento ósseo de reabsorção de células osteoclásticas (GOUDARZI *et al.*, 2019; SHARIFIANJAZI, 2019; MOGHANIAN, 2018).

Este metal é semelhante ao cálcio em seus aspectos físico-químicos e biológicos, além de não apresentar níveis de toxicidade à saúde humana. Sua principal via de bioacumulação é a fase mineralizada do tecido ósseo, preferencialmente no osso cortical (JIMÉNEZ, 2019; USUDA *et al.*, 2007). Assim, considerando a melhora do crescimento ósseo devido à liberação do íon estrôncio, a estimulação dos osteoblastos pode ser combinada com o efeito na fixação óssea gerando vidros bioativos superiores quando o Ca é substituído por Sr (JIMÉNEZ, 2019; MOGHANIAN, 2018; TAHERKHANI *et al.*, 2016). As composições de BG contendo 5% em peso de Sr aumentaram a diferenciação osteoblástica devido à liberação de íons das partículas de vidro bioativo no meio de cultura, resultando em material de enxerto ósseo promissor (ISAAC *et al.*, 2011). Além disso, a incorporação de Sr^{2+} na composição dos biomateriais inibe o crescimento bacteriano (LI, 2010).

Gel-BG 58S contendo Sr (25, 50, 75 e 100 mol%) foram investigados usando um precursor de fósforo diferente, dietilfosfatoetiltrióxissilano, resultando em materiais com mais cristalinidade para maiores níveis de Sr na composição [30]. A tendência à cristalização dos vidros à medida que o teor de Sr aumenta (5, 10, 25, 50 e 100 mol%) também foi observada quando o TEP foi usado como fonte de fosfato na síntese do gel-BG 58S (TAHERKHANI *et al.*, 2016).

Quando comparado com o vidro bioativo sem estrôncio, a dissolução na presença de estrôncio foi reduzida (LAO *et al.*, 2009) A liberação deste elemento em baixas concentrações quando em contato com o meio biológico foi observada em sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ e $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ contendo (1 ou 5% em peso de Sr) (LAO *et al.*, 2009). O BG (1 ou 5% em peso de Sr) também apresentou liberação controlada de Sr no meio biológico, devendo assim auxiliar no processo de remodelação óssea (LAO *et al.*, 2009). Outros trabalhos também mostraram que a incorporação de estrôncio (7,9% em peso de Sr) (HESARAKI, 2010) ou (2, 4, 6 e 8% em mol) pareceu diminuir ligeiramente a taxa de precipitação de fosfato de cálcio, sendo que a amostra com 6% em mol SrO exibiu bioatividade e proliferação celular apropriadas (GOUDARZI *et al.*, 2019). O mecanismo proposto para a diminuição da bioatividade é o bloqueio dos sítios ativos de crescimento do fosfato de cálcio pelo Sr^{2+} em vidros bioativos substituídos por Sr (MOGHANIAN, 2018). Por outro lado, foi observado que a presença de estrôncio (5, 10, 25, 50 e 100 mol%) acelera significativamente a produção de uma camada de hidroxiapatita sobre a superfície das partículas de BG (TAHERKHANI *et al.*, 2016; LAO *et al.*, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral produzir blendas à base de cimento de aluminato de cálcio contendo vidro bioativo e estrôncio, que apresentem propriedades superiores às do cimento de aluminato de cálcio quanto à bioatividade e resistência mecânica visando aplicação no reparo do tecido ósseo.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Realizar um estudo sistemático sobre a rota sol-gel para a produção do vidro bioativo (BG58S) visando dominar as tecnologias de síntese e entendimento da influência de variáveis desse processo sobre a sua composição;
2. Caracterizar o vidro bioativo (BG58S) obtido quanto à distribuição de tamanho de partículas, cristalinidade e composição química;
3. Desenvolver blendas pela combinação de vidro bioativo selecionado com biocimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH);
4. Caracterizar as blendas obtidas quanto à densidade, microdureza, resistência mecânica à compressão uniaxial, porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros;
5. Desenvolver blendas pela combinação de vidro bioativo (BG) selecionado com biocimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) incorporando óxido de estrôncio (SrO);
6. Caracterizar as blendas obtidas quanto à bioatividade e testes de cultura celular (*in vitro*) assim como também nas blendas com óxido de estrôncio (SrO);
7. Avaliar o comportamento das blendas selecionadas quanto à viscosidade e injetabilidade;
8. Avaliar a influência das blendas selecionadas quanto à neoformação óssea (*in vivo*).

3 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo contempla o estado da arte de tópicos fundamentais para a compreensão e desenvolvimento deste trabalho. Os assuntos abordados são: osso, cimento de aluminato de cálcio (CH), vidro bioativo (BG) e dopantes utilizados para o estímulo a regeneração óssea.

3.1 O osso

Dentre os sistemas que compõem o corpo humano, o sistema esquelético é o responsável pela sustentação e modelação do corpo e suas funções incluem a proteção dos tecidos moles, órgãos vitais e a realização de movimentos. Para isso, o principal constituinte deste sistema, o osso, possui uma estrutura complexa que lhe permite desempenhar tais funções de modo correto, na ausência de complicações e patologias (AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

3.1.1 A composição química do osso

O tecido ósseo, o qual forma os ossos, constitui um tipo de tecido conjuntivo especializado, o qual é formado basicamente por uma parte orgânica e uma parte inorgânica (mineral). A matriz óssea, ou matriz extracelular mineralizada, é composta pela parte orgânica, correspondente de 25 a 30%, e parte inorgânica de 65 a 70%. A parte orgânica compreende majoritariamente fibras colágenas, constituídas de colágeno tipo I, além de proteoglicanos e glicoproteínas, que tem participação na mineralização da matriz. Esta contém, em pequenas quantidades, fosfoproteínas, citocinas, osteocalcinas (estimulante da atividade dos osteoblastos) e osteonectinas (facilitador da deposição de cálcio), que, durante a síntese da matriz orgânica realizada pelos osteoblastos, são capazes de formar um arcabouço, permitindo a deposição de sais minerais. Já na parte inorgânica, os íons em maior quantidade são o fosfato e o cálcio, porém, também são encontrados bicarbonato, citrato, potássio, magnésio e sódio (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013;).

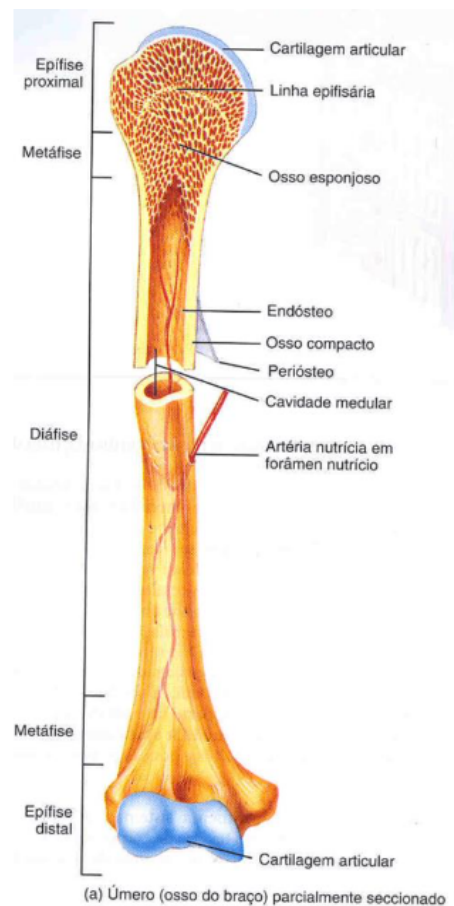
3.1.2 A estrutura do osso e suas células

O tecido ósseo é dinâmico, pois ao longo de toda a vida encontra-se em constante remodelação, sendo responsável pela movimentação, sustentação, modelação, proteção de

órgãos vitais do corpo e medula óssea. Para o desempenho de todas as suas funções, o sistema ósseo apresenta uma estrutura bastante complexa que deve ser constantemente renovada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; SANTOS, 2011).

A estrutura do osso é formada por duas partes principais sendo elas a diáfise, que corresponde ao corpo do osso, e a epífise, que está presente nas extremidades ósseas. A diáfise é constituída principalmente por osso compacto que proporciona uma barreira protetora para armazenar a medula óssea. A epífise apresenta osso esponjoso, o qual é formado pelas trabéculas ósseas que conferem propriedades estruturais ao osso. A Figura 1 apresenta a estrutura de um osso longo, onde podem ser observadas a diáfise e a epífise.

Figura 1 -Estrutura de um osso longo.

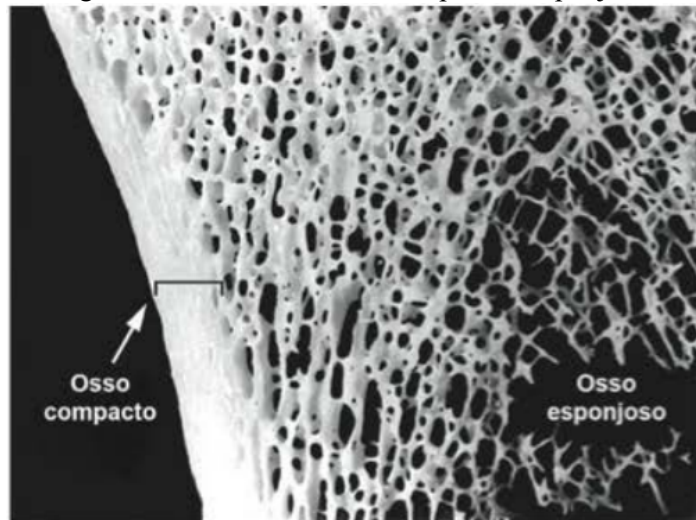


Fonte: adaptado de Akers e Denbow (2008).

Além das funções fundamentais de sustentação, proteção e locomoção, o osso representa a maior reserva de cálcio do organismo, aloja a medula óssea e proporciona apoio aos músculos esqueléticos. Quando são analisadas as estruturas macro e microscópicas do osso, algumas

diferenças importantes podem ser notadas. Considerando a estrutura macroscópica, o osso possui duas formações com mesma constituição, porém, diferentes em estrutura e função. O primeiro é o osso compacto (ou cortical), que não possui cavidades visíveis e sua estrutura é sólida e homogênea. O segundo se denomina osso esponjoso, com muitas cavidades visíveis que constituem o alojamento da medula óssea, como apresentado na Figura 2 (AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 2 - Estrutura do osso compacto e esponjoso.



Fonte: Junqueira; Carneiro, 2013.

Quanto a localização, o osso compacto é encontrado em uma delgada camada superficial compacta nas extremidades, ou epífises, assim como na totalidade da diáfise, ou corpo, dos ossos longos. Este também é encontrado na periferia dos ossos curtos, formando uma envolta camada compacta. Os envoltórios rígidos formados pelo osso compacto caracterizam resistência a deformação (AKERS; DENBOW, 2008). O osso esponjoso é encontrado na região central dos ossos longos e curtos, inclusive na delimitação do canal medular e nas epífises dos ossos longos. Os trabéculas da matriz óssea do osso esponjoso proporcionam aspecto poroso ao tecido e são preenchidos pela medula óssea, chamada hematogena quando em recém-nascidos, apresentam coloração vermelha devido à alta porcentagem de hemácias e produção de células do sangue; e a medula óssea amarela que, com o aumento da idade, passa a ser infiltrada com tecido adiposo (AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Considerando a estrutura microscópica, ou histológica, o tecido ósseo se divide em primário (ou imaturo) e secundário (maduro ou lamelar). Os dois tecidos apresentam os mesmos constituintes, entretanto, o tecido imaturo é temporário, o que indica que é o primeiro tecido a aparecer no desenvolvimento embrionário, assim como no reparo de fraturas, sendo substituído

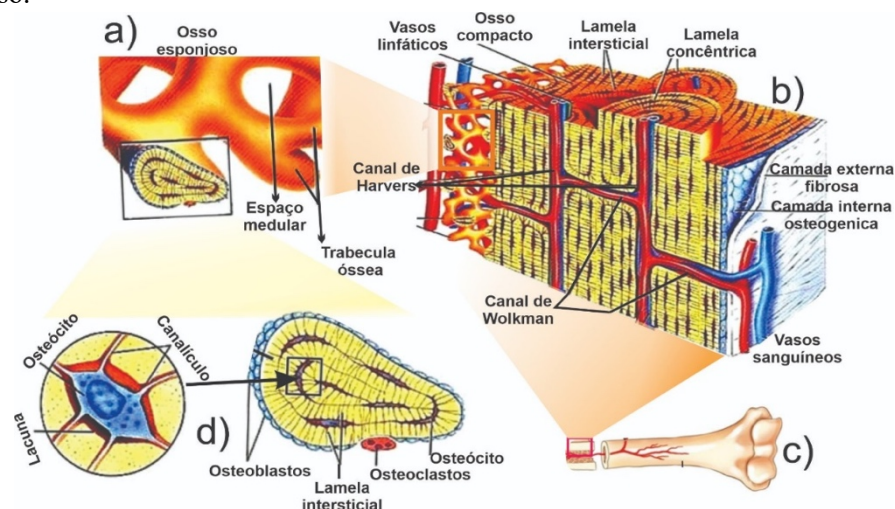
gradativamente pelo tecido maduro. O tecido primário apresenta fibras colágenas desorganizadas e dispostas em várias direções (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O tecido ósseo maduro possui as fibras colágenas organizadas em faixas paralelas entre si, denominadas lamelas, entre as quais estão situadas as lacunas dos osteócitos, ou concêntricas em torno de canais com vasos, formando o sistema de Havers. Em um grupo de lamelas ocorre, geralmente, o acúmulo de matriz mineralizada em ausência de colágeno, denominada substância cimentante (AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Cada sistema de Havers possui de quatro a vinte lamelas ósseas e no centro, um canal que contém vasos, o canal de Havers, que se comunicam com a cavidade da medula e superfície óssea externa através dos canais de Volkmann, que são oblíquos ou transversais em relação aos canais de Havers, atravessando as lamelas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Nesta estrutura, apresentada na Figura 3, também é citável um revestimento por tecido conjuntivo fino e células osteogênicas, constituindo o endóstio e o perióstio, que nutrem o tecido e fornecem osteoblastos para o crescimento ósseo. O endóstio reveste as cavidades do tecido ósseo esponjoso, e os canais medulares, de Havers e de Wolkman. Já o perióstio contém fibras colágenas, denominadas, neste caso, de fibras de Sharpey, que fixam este fino tecido ao tecido ósseo (AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

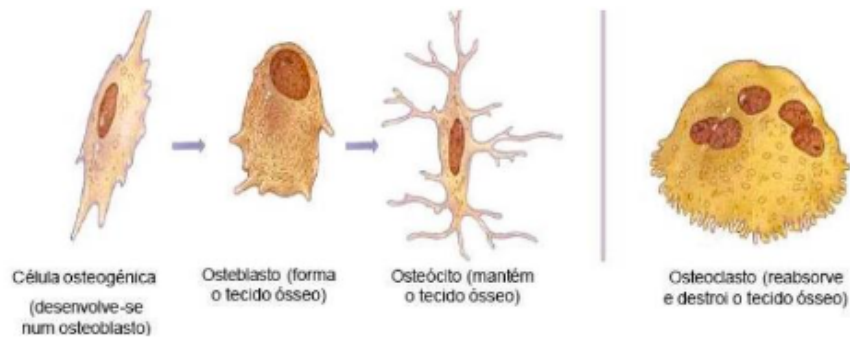
Figura 3 - Representação simplificada da estrutura de um osso longo: a) magnificação do osso esponjoso; b) magnificação da secção; c) secção transversal do osso; d) magnificação da estrutura do osso esponjoso.



Fonte: Adaptado de Wers, 2014.

O osso é formado por vários tipos de células e entre elas destacam-se os osteoblastos, os osteócitos, osteoclastos e as células osteoprogenitoras (AKERS; DEWOW, 2008). As respectivas estruturas das células ósseas mencionadas são apresentadas na Figura 4.

Figura 4 – Células ósseas.



Fonte: Tormena, 2009.

Os osteoblastos correspondem às células responsáveis pela síntese e mineralização da parte orgânica da matriz óssea, ou seja, o colágeno tipo I, os proteoglicanos e as glicoproteínas. Localizam-se nas superfícies ósseas e estão dispostos lado a lado sobre o osteóide (superfície em formação) de forma semelhante a um arranjo que se parece com um epitélio simples, apresentando estrutura em forma de cuboide quando em atividade intensa e, formato achatado quando encontra-se em pouca atividade (AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Durante a síntese do osso, os osteoblastos secretam matriz orgânica e então, a mineralizam. Estas células exibem níveis elevados de fosfatase alcalina, que é uma enzima que contribui para a mineralização da matriz e na formação de cristais de hidroxiapatita. Quando estes estão adjacentes à matriz orgânica recém sintetizada, pequenas vesículas são desenvolvidas pela superfície, desprendendo-se dos osteoblastos. As vesículas da matriz, como são denominadas, contêm glicoproteínas em seu interior e fosfatase alcalina na membrana, que hidrolisam os íons fosfato internalizando-os para a vesícula. Após este processo, ocorre uma supersaturação de fosfato e cálcio no interior das vesículas que, após romperem-se, espalham a precipitação de fosfato de cálcio formado pela matriz (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; AKERS; DENBOW, 2008).

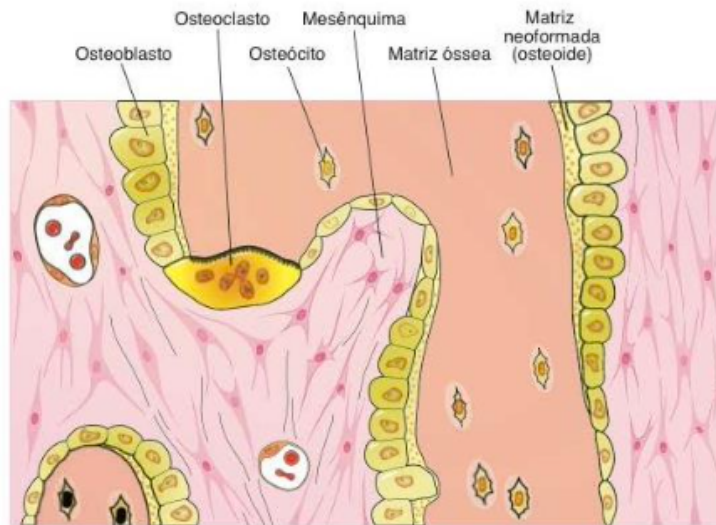
Quando sofrem as mudanças morfológicas e funcionais que culminam com a diminuição de secreção de proteínas, os osteoblastos são transformados em células de revestimento ósseo, representando o fenótipo final da linhagem osteoblástica. Nesta fase, estas células recobrem as superfícies quiescentes e formam uma camada de células interconectadas com a função homeostática, regulando a concentração plasmática de cálcio, além de estarem associadas ao remodelamento ósseo. Na deposição da matriz ao redor do corpo das células e prolongamentos, são formados as lacunas e os canaliculos, portanto, quando aprisionados, os osteoblastos tornam-se osteócitos (AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os osteócitos são as células responsáveis pela manutenção de nutrientes e se localizam no interior da matriz óssea. São células de morfologia elíptica, achatada e apresentam poucas organelas de síntese e secreção, o que evidencia atividade metabólica pobre, porém, indispensável para a manutenção da homeostase óssea. São encontrados aprisionados no interior da matriz óssea, sendo um por lacuna, com seus diversos prolongamentos situados no interior de canaliculos. Os prolongamentos estabelecem junções comunicantes tipo gap entre os osteócitos a outros osteócitos adjacentes e osteoblastos, por onde passam pequenas moléculas e íons, permitindo que todos possam responder às modificações sistêmicas e superficiais. Dessa forma, os canaliculos constituem uma rede responsável pela manutenção e vitalidade da matriz, portanto são essenciais para a manutenção óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, que possuem áreas específicas com porções dilatadas, depositadas em depressões escavadas pela atividade dessas células, conhecidas como lacunas de *Howship*. Além da função principal de promoção de desmineralização e degradação da matriz óssea, os osteoclastos podem internalizar também os osteócitos da reabsorção óssea e como são células móveis, tem a migração estimulada pelos osteoblastos em apoptose para os sítios a serem reabsorvidos, que então reconhecem estes e internalizam essas células apoptóticas, sendo assim, o processo é auto regulável, ou seja, é dependente da necessidade do tecido, devido também à dissolução mineral que precede a degradação da matriz, promovendo a migração deste tipo celular pelo tecido (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Um esquema da disposição das células no tecido ósseo é apresentado na Figura 5.

Figura 5 – Esquema da disposição das células no osso.



Fonte: Junqueira e Carneiro, 2013.

Do ponto de vista morfológico, os osteoclastos são células gigantes e multinucleadas, devido à sua formação pela fusão de precursores mononucleados provindos da medula óssea quando em contato com o tecido ósseo. A superfície ativa dos osteoclastos possui prolongamentos vilosos, adjacente à superfície óssea, formando uma borda em escova e em sua periferia, há uma região citoplasmática apoiada na matriz óssea como um local de adesão, denominado zona clara (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A zona clara é rica em actina e miosina e engloba o microambiente de reabsorção óssea, pois é o local onde ocorre a desmineralização e degradação da matriz tecidual. Durante o processo de desmineralização e degradação, os osteoclastos secretam ácido e enzimas proteolíticas para dentro da zona clara, que atuam localmente na digestão da matriz orgânica e dissolução dos cristais de sais de cálcio (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; AKERS; DENBOW, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

3.1.3 Propriedades biomecânicas do osso

Durante a vida, o tecido ósseo apresenta alta capacidade de adaptação aos diversos estímulos mecânicos que estão associados às atividades fisiológicas. Estes estímulos podem ser classificados em estímulos estáticos ou estímulos dinâmicos. Os estímulos correspondem às solicitações mecânicas que ocorrem por conta da gravidade ou de atividade muscular, por

exemplo. Para atender a esses estímulos, o osso apresenta propriedades intrínsecas, como dureza, força e elasticidade (JUDAS et al., 2012; EMI, 2014; GRAÇA, 2018).

A dureza do osso está associada à parte inorgânica da matriz extracelular mineralizada, a qual é representada pelos íons cálcio e fosfato. A associação das fibras de colágeno à hidroxiapatita, que é formada pelos íons cálcio e fosfato, fornece ao tecido ósseo rigidez e resistência. Vale lembrar, no entanto, que o osso compacto possui rigidez e resistência maiores que as do osso esponjoso, já que existe uma diferença microestrutural entre esses tipos de ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; EMI, 2014; GRAÇA, 2018).

O tecido ósseo também possui um certo grau de elasticidade, o qual é conferido pela parte orgânica da matriz extracelular mineralizada, que apresenta predominância de colágeno em sua constituição, viabilizando assim o tecido ósseo a suportar forças de tração (EMI, 2014).

Considerando a estrutura do osso pode-se defini-lo como um material multifásico e poroso, o qual apresenta comportamento anisotrópico, isto é, as propriedades mecânicas apresentam comportamentos diferentes dependendo da direção (GRAÇA, 2018).

A análise das propriedades mecânicas do osso, permitem afirmar que o tecido ósseo pode suportar certo grau de compressão e tração sem que ocorram fraturas. Porém, quando a força de resistência do osso é excedida, pode ocorrer a fratura ou lesão traumática, causando a perda da integridade do tecido ósseo (EMI, 2014; GRAÇA, 2018).

3.1.4 A remodelação óssea

A remodelagem é o termo usado para descrever processos de reabsorção e formação de tecido mineralizado que mantém a massa e a morfologia. A manutenção de concentrações adequadas de cálcio no sangue é prioritária sobre a manutenção da integridade estrutural do osso (JOHNSON, 2000).

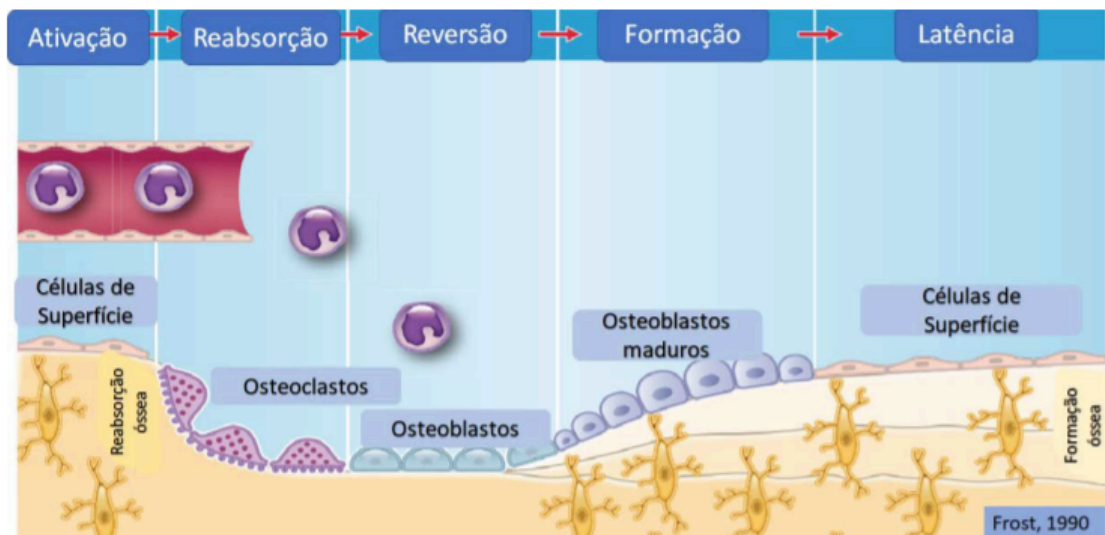
O remodelamento é um mecanismo de substituição, ou reconstrução, de áreas de tecido ósseo de modo a preservar a sua integridade, otimizar a sua função e prevenir a sua degradação. Nesse processo, duas atividades ocorrem: a formação e reabsorção óssea do tecido, processos realizados por células do tipo osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. A Figura 6 apresenta um esquema simplificado desse processo.

O osso sofre um processo contínuo de remodelação, em um mecanismo natural de reconstrução das áreas do tecido ósseo de modo a manter a sua integridade, preservando-o de degradações. Essas modificações são realizadas em várias fases, como na transição de um osso

primário em maduro, no crescimento e manutenção morfológica, na transição do osso esponjoso para compacto, ou seja, para adaptação nas diversas situações fisiológicas e patológicas, dado a reabsorção e deposição de matriz óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006)

Esse processo é iniciado com a ativação dos osteoclastos pela remoção dos osteóides e exposição da matriz mineralizada, ou pela ativação de citocinas. Em seguida, a formação do osso é dependente da proliferação e migração das células osteoprogenitoras, além da diferenciação dos osteoblastos, controlados por uma cascata de eventos genéticos pela regulação dos genes de fatores locais e sistêmicos. Estes fatores, são os hormônios, citocinas e fatores de crescimento, como o PTH, vitamina D, interleucinas (IL-1, IL-6), TNF- α , RANKL, RANK e osteoprotegerina (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; DUQUE NETTO; NASCIMENTO, 2012).

Figura 6 – Esquema ilustrativo da remodelação óssea



Fonte: Adaptado de Frost, 1990.

Os fatores supracitados realizam a estimulação de liberação de moléculas pelos osteoblastos a fim da migração e adesão à superfície óssea, para a atividade de produção de matriz óssea e controle dos osteoclastos, sendo assim, um equilíbrio entre a dinâmica dos osteoblastos e osteoclastos, ou seja, formação e reabsorção, é imprescindível para a remodelação óssea. Um desequilíbrio nesta atividade pode ocasionar reabsorções patológicas como artrites ou até mesmo tumores. Outros fatores podem interferir no processo de equilíbrio, como por exemplo: idade, doenças ósteo-metabólicas, mobilidade diminuída e ação de drogas (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; NASCIMENTO, 2012).

3.2 Biomateriais

A ciência dos materiais tem contribuindo significativamente para o rápido avanço de tecnologias cirúrgicas e médicas ao longo de várias décadas. A primeira geração de materiais para serem utilizados no corpo humano foi desenvolvida entre as décadas de 60 e 70 e esses materiais foram denominados biomateriais.

Para que um material possa ser considerado biomaterial ele deve apresentar uma combinação adequada de propriedades físicas que sejam similares às do tecido que irá substituir, e não deve ser citotóxico (SALOMÃO *et al.*, 2010) permitindo assim, a recuperação das funções do tecido lesionado devido a acidentes ou doenças degenerativas (ANDRADE *et al.*, 2014).

De acordo com Wan *et al.* (2006) e Seitz *et al.* (2009) os biomateriais apresentam três características principais:

(a) Biocompatibilidade: que pode ser descrita como a habilidade que um material tem para desenvolver um estímulo tecidual adequado para uma aplicação específica.

(b) Biofuncionalidade: corresponde à propriedade do biomaterial exercer funções estéticas e/ou dinâmicas necessárias quando implantado.

(c) Bioatividade: corresponde à capacidade apresentada pelo biomaterial de interagir com tecidos vivos, promovendo estímulos de processos físico-químicos que são naturais do sistema biológico. Dessa forma favorecem a integração do biomaterial com o meio que em foi implantado. Embora essa característica não seja obrigatória, ele tem se tornado cada vez mais desejável.

Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo, ou ainda como um material viável utilizado em um dispositivo médico, com intenção de integrar com sistemas biológicos. Alguns biomateriais sintéticos com estrutura físico-química similar à matriz óssea têm sido desenvolvidos para permitir a rápida penetração das células, nervos e vasos sanguíneos em direção ao interior do material, com isso é possível a regeneração e remodelação do tecido natural, mantendo sua função biológica (CASTRO-RAUCCI *et al.*, 2011).

De modo geral, os biomateriais podem classificados como: metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos. Nesta classificação também estão incluídos os implantes formados por materiais compósitos bioativos que representam uma combinação das biocerâmicas com vidros bioativos, ou então, associação de biocerâmicas com fibras poliméricas. Os biomateriais assim formados, apresentam propriedades das classes de materiais empregados para a sua

produção e dessa forma tornam-se bastante atraentes para determinadas aplicações tais como: implantes dentários, aplicações ortopédicas, reparos cranianos entre outros.

Considerando a resposta biológica, pode-se considerar a seguinte classificação:

(a) Materiais biorreativos: dentro dessa categoria temos os metais empregados em ortopedia e em implantodontia. Porém, esses biomateriais metálicos não apresentam biorreatividade podendo assim serem considerados como bioinertes. No caso de metais biorreativos os mesmos de encontram no limite entre os materiais bioinertes e os bioativos. Os metais podem adquirir bioatividade se sofrerem um tratamento de ativação em sua superfície empregando o seu óxido. São exemplos desse tipo de material o titânio, o nióbio e o tântalo (PARIDA, 2012)

(b) Materiais bioativos: este tipo de material apresenta resposta biológica específica quando interage com o tecido vivo, dessa forma ocorre o aparecimento de uma ligação entre o material e o tecido. Sendo assim, ocorre uma interação íntima tecido sem a intervenção da camada de tecido fibroso. Tudo indica que essa interação osso-implante, é tipo química, já que estudos apontam que os componentes minerais e orgânicos que estão presentes no fluido do corporal humano têm papel fundamental nesse processo. Os vidros bioativos e as biocerâmicas de fosfato de cálcio são os materiais mais utilizados dentro dessa categoria os vidros bioativos e as biocerâmicas de fosfato de cálcio (DAVIS, 2003).

(c) Materiais reabsorvíveis: estes materiais permanecem junto aos tecidos biológicos por um determinado período e, na sequência acabam sendo degradados, solubilizados ou então fagocitados. Após cumprirem seu papel no organismo, são suprimidos sem necessidade de outro processo cirúrgico, sendo os mais utilizados o fosfato tricálcio e ácido poli (ácido láctico) (ENGQVUST, 2008). Deve-se levar em consideração os produtos formados durante a decomposição desses materiais não podem apresentar toxicidade, já que serão eliminados organismo do paciente.

A seleção de biomateriais é realizada tendo como foco a sua aplicação. No caso do osso, os materiais devem ser preferivelmente osteoindutivos (capazes de promover a diferenciação de células progenitoras por um osteoblasto), osteocondutores (suportar o crescimento ósseo e incentivar o crescimento do osso circundante) e ter a capacidade de osteointegrar (capaz de integrar o osso circundante) (BURGUER, 2013). Adicionalmente, a regeneração de tecido envolve o uso de biomateriais na forma de pó, soluções ou micropartículas dopadas para estimular o reparo tecidual localizado. Os materiais bioativos liberam substâncias químicas de produtos de dissolução iônica ou fatores de crescimento em taxas controladas, por difusão ou

ruptura de rede que ativam as células em contato com os estímulos. As células produzem fatores de crescimento adicionais que, por sua vez, estimulam múltiplas gerações de células em crescimento para se auto diferenciarem nos tecidos necessários ao longo dos processos bioquímicos e biomecânicos (LOOF, 2008).

Em relação ao tipo de material, os biomateriais podem ser macromoléculas naturais, metais, cerâmicos e polímeros sintéticos, que são processados para atenderem as especificações de dispositivos médicos que estarão em estreito contato com os componentes minerais e orgânicos que estão presentes no fluido do corporal humano (SEITZ *et al.*, 2009).

Devido ao desenvolvimento ocorrido na área de biomateriais, eles passaram a ser empregados em diversos setores clínicos, tais como ortopedia, odontologia e inclusive a área de fármacos. Há uma diversidade de produtos que incluem substituição óssea, prótese ocular, articulações, válvulas cardíacas, tecido cutâneo, prótese mamária, próteses ortopédicas entre outros. No setor de fármacos existem polímeros que apresentam a propriedade de liberação de medicamentos de forma controlada, de acordo com a sua velocidade de absorção pelo organismo (LOOF, 2008).

Dentre os biomateriais, as biocerâmicas destacam-se por apresentarem a característica de biocompatibilidade e têm encontrado grande potencial de aplicação no organismo humano e como liberadores de fármacos (MOREJON-ALONSO *et al.*, 2012), além de possuírem uma estrutura semelhante ao componente inorgânico do osso, a hidroxiapatita.

De acordo com Hench (1993), a resposta interfacial provocada pelas interações biológicas entre o material de implante e o tecido receptor, as biocerâmicas podem ser classificadas como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Relação entre o tipo de material do implante e a resposta do tecido.

Material	Tipo de resposta
Material tóxico	O tecido circunvizinho morre
Material não-tóxico e biologicamente inativo (quase inerte)	Um tecido fibroso de espessura variável é formado
Material não-tóxico e biologicamente ativo (bioativo)	Uma ligação é formada na interface
Material não tóxico e absorvível	É substituído pelo tecido circunvizinho

Fonte: O Autor.

É importante lembrar que nenhum material implantado no corpo humano é totalmente inerte, todos os materiais promovem uma resposta do tecido hospedeiro. Um implante tóxico e que prejudica o tecido ao seu redor, é claro que deve ser evitado. A reação biologicamente inerte, que causa o desenvolvimento de uma capsula fibrosa ao seu redor é o tipo mais comum

de resposta tecido-implante. Esta cápsula é uma resposta protetora que evita o contato do tecido com o implante (LUZ; MANO, 2011).

A reação bioativa forma uma ligação através da interface entre o implante e o tecido. Esta ligação evita o movimento entre os dois materiais conectados e imita o tipo de interface formada quando tecidos naturais se auto-reparam. Para esse tipo de ligação ser formada os materiais implantados precisam apresentar algum grau de atividade química. Uma importante característica de uma interface bioativa é que ela muda com o tempo, assim como os tecidos naturais os quais estão em um estado de equilíbrio dinâmico.

Um caso específico de interface bioativa ocorre quando a mudança química na interface é suficientemente rápida, sobre a qual o material dissolve ou é resborsvido e é consequentemente substituído pelo tecido ao seu redor. A taxa de reabsorção, isto é, o tempo que leva para o que o implante seja substituído pelo tecido pode variar dependendo do material escolhido. Um implante pode se conectar ao tecido por vários mecanismos. Tais mecanismos são classificados como mecânico, crescimento de tecidos dentro dos poros, ligação interfacial com tecidos e substituição de tecidos (NARASARAJU; PHEBE, 1996).

Dentre os biomateriais uma classe que se destaca quando se pensa em reparo ósseo, são as biocerâmicas as quais apresentam características que possibilitam sua utilização para substituição do tecido ósseo. Essa classe de biomaterial apresenta uma estrutura semelhante ao componente inorgânico do osso, a hidroxiapatita.

As biocerâmicas, são biocompatíveis, osteocondutivas e não apresentam proteínas em sua composição, sendo assim não apresentam resposta imunológica, dessa forma o risco de rejeição é extremamente baixo (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Possuem ainda, alto tempo de degradação *in vivo* o que permite que ocorra a remodelação óssea no local onde ocorreu o implante (LUZ; MANO, 2014). Dentre as biocerâmicas destacam-se as cerâmicas ligadas quimicamente as quais são produzidas por reações em baixas temperaturas e geralmente são formadas pela combinação entre um pó e um líquido (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

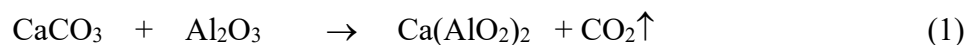
Os biomateriais cerâmicos apresentam ainda como vantagens a baixa reatividade química, pois são praticamente inertes, apresentam boa resistência à compressão, alta resistência ao desgaste e pequeno coeficiente de atrito, o que é interessante para aplicação em articulações, no caso das próteses de quadril. As biocerâmicas podem ser produzidas em diversas formas e fases, sendo capazes de cumprir diferentes papéis na reparação do corpo. São utilizadas na forma densa ou porosa com um formato específico, sendo utilizadas para preencher espaço enquanto ocorre o processo natural de recuperação do organismo (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Entre os diferentes tipos de biocerâmicas com potencial para uso no reparo do tecido ósseo, o presente trabalho destaca o cimento de aluminato de cálcio.

3.2.1 Cimento de Aluminato de Cálcio

Dentre as biocerâmicas, o aluminato de cálcio apresenta duas características inerentes que o tornam mais adequado frente aos outros quando se pensa em aplicações onde carga é requerida, como por exemplo em tratamento de fraturas vertebrais e dentes. O aluminato de cálcio apresenta alto consumo e modificação de água durante seu endurecimento e reações de cura endurecendo relativamente rápido. A alta transformação da água proporciona ao sistema uma resistência alta que é várias vezes superior à do fosfato de cálcio, por exemplo. Permite também uma larga variação na consistência e formulação de composições podendo ser empregado para muitas aplicações, além de apresentar boa biocompatibilidade.

A produção comercial do cimento de aluminato de cálcio (CAC) acontece por meio do de calcinação de uma mistura de formada por Al_2O_3 e CaCO_3 , onde os valores de temperatura entre ficam entre 1315 e 1425°C, como descrito por meio da equação química (1).



Inicialmente são formadas as fases cristalinas de aluminatos que apresentam altos teores de Ca. Devido ao aumento da temperatura maiores quantidades de CaO e Al_2O_3 começam a reagir com os produtos formados inicialmente havendo, dessa forma, a síntese de outras fases as quais apresentam menores quantidades de Ca (ROEMHILDT; MCGEE; WAGNER, 2003).

Todas essas fases produzidas apresentam propriedades diferentes em relação à reatividade e à água pois, em geral, quanto maior a quantidade de CaO presente, maior será a reatividade. Nos cimentos comerciais as principais fases cristalinas são C_{12}A_7 , CA e CA_2 , sendo C (CaO) e A (Al_2O_3) (MOREJON- ALONSO *et al.*, 2012).

No processo de hidratação das partículas de cimento estão envolvidos três períodos diferentes: primeiramente ocorre a dissolução de íons, seguida de nucleação e precipitação das fases hidratadas. Assim que as partículas de cimento entram em contato com a água, tem a início a dissociação das fases anidras de aluminato de cálcio e ocorre a liberação, no meio líquido, dos íons cálcio (Ca^{2+}) e tetra hidróxido aluminato ($\text{Al}(\text{OH})_4^-$). A dissolução ocorrerá

até que a ocorra um certo nível de concentração desses íons na solução aquosa e a mesma alcance um certo nível de saturação, o que promoverá a precipitação na forma de hidratos de aluminato de cálcio, o que pode ser explicado pelos mecanismos de nucleação e crescimento. A concentração de íons em solução, para níveis abaixo da condição de saturação, é diminuída pela precipitação dos primeiros produtos hidratados o que diminui a concentração de íons em solução para níveis abaixo da condição de saturação, favorecendo a dissociação de fases anidras. Este processo de dissolução-precipitação é contínuo e ocorrerá até que a maior parte da fase anidra tenha reagido. Caso haja favorecimento da nucleação heterogênea na superfície das partículas, as fases hidratadas precipitadas formarão fortes ligações entre partículas vizinhas, propiciando o endurecimento ou pega do cimento (AZEVEDO *et al.*, 2007; HEJAZIA; AHMADIANA, 2014).

Devido à sua facilidade de reação de hidratação a temperatura ambiente com possível de ajuste tempo de endurecimento e reologia, baixo custo, alta resistência mecânica e alta resistência à corrosão, o CAC constitui o agente ligante mais utilizado em aplicações refratárias (KOPANDA; MACZURA, 1990). Em 1987, Hermansson iniciou um estudo visando sua aplicação na área da saúde no campo odontológico, com o objetivo de produzir um material que possibilitasse um processo de restauração dental mais biocompatível do que a amálgama (HEJAZIA; AHMADIANA, 2014).

Atualmente, o CAC vem se destacando entre as biocerâmicas no reparo de ossos, devido a sua propriedade de prevenção do micro infiltração bacteriana (RADWAN *et al.*, 2017) entre outras vantagens há sua coloração branca e o desenvolvimento de pega hidráulica. Pode-se citar ainda que sua aplicação pode realizada em campo úmido sendo o tempo de reação controlado pela adição de determinados aditivos. Também representam atrativos a sua habilidade de formar apatita *in situ* indicando sua bioatividade, boa fluidez e condições de trabalhabilidade (HEJAZIA; AHMADIANA, 2014).

Adicionalmente, o cimento de aluminato de cálcio como biomaterial é indicador indicado também para o uso na ortopedia devido a suas propriedades tais como: como alta viscosidade, permitindo injeção direta após a mistura, baixa reação exotérmica e alta biocompatibilidade (LUZ; MANO, 2014). Estudos mostram que a aplicação do CAC para reparação de defeitos ósseos apresenta excelentes resultados devido a sua composição e seu coeficiente de expansão serem semelhantes ao do dente e osso humano (MOREJON-ALONSO *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de composição de CAC contendo fosfato tricálcico (α -TCP) tem mostrado que cimentos mistos são menos citotóxicos e mais biocompatíveis que o cimento ósseo convencional (cimentos resinosos, os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, e os cimentos

contendo hidróxido de cálcio) (LUZ; MANO, 2014). As cerâmicas de fosfato de cálcio possuem variadas aplicações biomédicas sendo usadas para reparar defeitos ósseos e no aumento e manutenção de cristas ósseas alveolares. Outra cerâmica de fosfato de cálcio é a hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, uma das mais interessantes biocerâmicas devido as suas similaridades química e cristalográfica com os componentes inorgânicos encontrados nos tecidos duros (dentes e ossos). Este composto apresenta alta biocompatibilidade, não induzindo a rejeição por parte do tecido ósseo e possibilitando a osteointegração e a osteocondução (NARASARAJU; PHEBE, 1996).

Cimentos com alta resistência mecânica, preparados a partir de fosfatos de cálcio e aluminato de cálcio têm sido desenvolvidos e avaliados para uso na reparação de ossos e articulações. Neste caso, a presença do fosfato de cálcio tende a melhorar a atividade biológica do material, enquanto o aluminato é responsável por fornecer alta resistência mecânica e uma boa resistência à corrosão quando em contato com fluidos corporais (MOREJON-ALONSO *et al.*, 2012).

3.2.2 O vidro bioativo

Desde a descoberta do primeiro composto de vidro bioativo, 45S5 Bioglass®, por L. Hench na década de 1960, uma série de trabalhos começou a investigar a reação do vidro bioativo e suas aplicações biomédicas (HENCH; WILSON, 1993). Os estudos primários sobre o vidro bioativo foram conduzidos para a compreensão de suas interações com o tecido ósseo e como ele pode se ligar diretamente ao osso em uma sequência de reações que levam à formação das camadas de hidroxiapatita. Além disso, as interações entre o vidro bioativo e o colágeno, tanto no osso quanto no tecido mole, foram também investigadas (CORBI *et al.*, 2012).

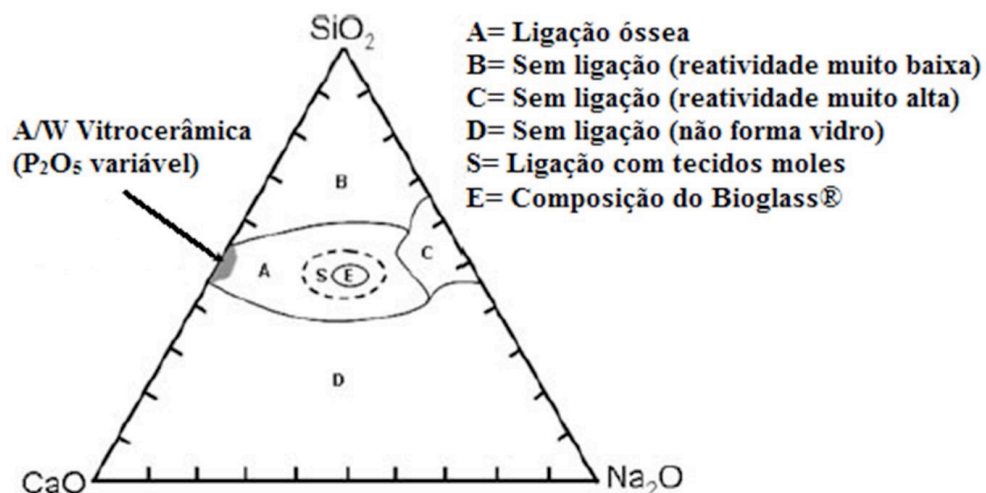
Os vidros bioativos foram o primeiro exemplo de material que pode se ligar aos tecidos vivos sem ser isolado em uma cápsula fibrosa e abriram o caminho para um conceito totalmente novo de materiais dentro da medicina. Pela primeira vez, foram desenvolvidos materiais que não apenas eram capazes de resistir dentro do corpo humano sem serem tóxico ou degradados, mas também podiam desempenhar um papel ativo nos processos de regeneração tecidual (HENCH; WILSON, 1993).

Diante disso, é fácil perceber o quanto esses materiais tornaram-se atraentes para fins médicos e porque eles têm sido tão amplamente estudados e investigados durante as últimas décadas. A facilidade em modificar uma composição de vidro e inserir quase todos os tipos de elementos dentro da rede amorfa criou uma variedade de possibilidades para adequar as propriedades dos vidros bioativos à uma série de aplicações diferentes dentro da medicina (DUCHEYENE; LEMONS, 1998). Na busca da melhoria das propriedades desse material, diversos tipos de vidros bioativos foram sintetizados e modificados por meio de alteração dos reagentes e suas razões molares e adição de novos elementos, com o objetivo de produzir vidros bioativos com propriedades específicas.

A síntese do Bioglass® 45S5 foi baseada no sistema ternário $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO}$, com a adição de óxido de fósforo (6% em peso). A composição foi escolhida perto do ponto eutético, a fim de se obter um material com baixa temperatura de fusão e fácil processabilidade (HENCH; WILSON, 1993).

Ao modificar a composição do Bioglass® 45S5, dentro do diagrama de fases ternário $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO}$ e adicionando outros óxidos, Hench e colaboradores encontraram vários tipos de vidros bioativos com diferentes propriedades tais como taxa de dissolução e capacidade de ligação tecidual, conforme pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 - Diagrama ternário do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$, com as regiões de formação de ligação entre material e tecidos. Composições da região A apresentam 6% em peso de P_2O_5 .



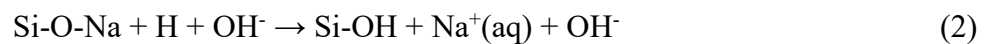
Fonte: Adaptado de Hench, 1993.

A principal desvantagem do vidro bioativo 45S5 diz respeito à sua fraca trabalhabilidade. Na verdade, a temperatura de transição vítrea e o início da cristalização são próximos, limitando

assim a possibilidade de sinterização. Tendo uma janela de sinterabilidade estreita, o vidro bioativo 45S5 não pode ser sintetizado sem cristalização (AZEVEDO *et al.*, 2007; HEJAZIA; AHMADIANA, 2014), o que envolve uma diminuição da bioatividade, embora a mesma não seja totalmente suprimida (ITO *et al.*, 2000).

Os estudos primários sobre o vidro bioativo foram conduzidos para a compreensão de suas interações com o tecido ósseo e como ele pode se ligar diretamente ao osso em uma sequência de reações que levam à formação das camadas de hidroxiapatita. A formação de ligação entre a interface do vidro bioativo e do tecido ósseo ocorre através de mudanças químicas e estruturais na superfície do material quando ele entra em contato com o meio aquoso do corpo. Segundo estudos (HENCH; WILSON, 1993) essas alterações ocorrem em 10 estágios, descritos a seguir.

(1) Primeiramente, ocorre troca iônica dos íons Na^+ e Ca^{2+} do material com H^+ ou H_3O^+ da solução, provocando hidrólise dos grupos de sílica e criando grupos silanóis (causando aumento do pH da solução), como representado pela equação química (2).



(2) A troca de cátions aumenta a concentração de hidroxilas na solução, promovendo o ataque do reticulado de sílica presente no material. Sílica solúvel é perdida para a solução na forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$ devido à quebras de ligação Si-O-Si, continuando a formação de grupos silanóis (Si-OH) na superfície do material, assim como representado pela equação química (3).



(3) As reações de condensação e repolimerização formam uma camada rica em SiO_2 na superfície do material.

(4) Há a migração dos grupos Ca^{2+} e PO_4^{3-} para a superfície através da camada rica em SiO_2 , produzindo um filme rico em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ que é formado acima da camada de sílica. Na sequência, há o crescimento deste filme amorfo de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ por meio da incorporação de cálcio e fósforo da solução.

(5) Ocorre a cristalização do filme amorfo de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ por meio da incorporação dos ânions OH^- e CO_3^{2-} oriundos da solução, produzindo assim uma camada de hidroxila de apatita carbonatada (HCA).

(6) Há a adsorção e dessorção de fatores de crescimento biológicos na camada de HCA (continuada durante todo o processo) para ativar a diferenciação de células.

(7) Há remoção dos detritos é realizada pelos macrófagos o que irá permitir a ocupação dos espaços pelas células.

(8) Nesta etapa, correm as ligações das células com a superfície bioativa.

(9) Ocorrerá a diferenciação das células para formação de células de crescimento ósseo (osteoblastos).

(10) Finalmente, a matriz extracelular é gerada pelos osteoblastos para formação do osso

Tendo como objetivo a obtenção de um novo vidro bioativo que apresentasse semelhança com o vidro bioativo 45S5, novas rotas de síntese foram estudadas e assim foi desenvolvido o vidro bioativo 58S nos anos 90, através do processamento via sol-gel. Esta nova rota de síntese mostrou-se bastante interessante pois o vidro bioativo 58S, ao contrário do 45S5, pode ser obtido em temperaturas mais baixas, da ordem da temperatura ambiente e, dessa forma, são eliminadas algumas desvantagens dos processos de fundição além do menor custo operacional e fácil produção de pós (ITO *et al.*, 2000).

O vidro bioativo 58S tem composição química: 60% SiO_2 , 36% CaO , 4% P_2O_5 (% em mol) e 58% SiO_2 , 33% CaO , 9% P_2O_5 (% em massa) e seu nome é originado a partir desta composição 58S (58% de SiO_2 em massa). Devido a sua composição e por ser processado via sol-gel, o 58S apresenta mais rápida formação de HCA na sua superfície em relação ao 45S5 (~5h *in vitro* e até 4 semanas *in vivo*). Este vidro bioativo apresenta degradação significativa com correspondente liberação de sílica solúvel e, além disso, estudos mostram que tratamentos realizados com os produtos da dissolução iônica deste vidro bioativo promovem a ativação celular por meio da proliferação de osteoblastos (GORDAN *et al.*, 2007).

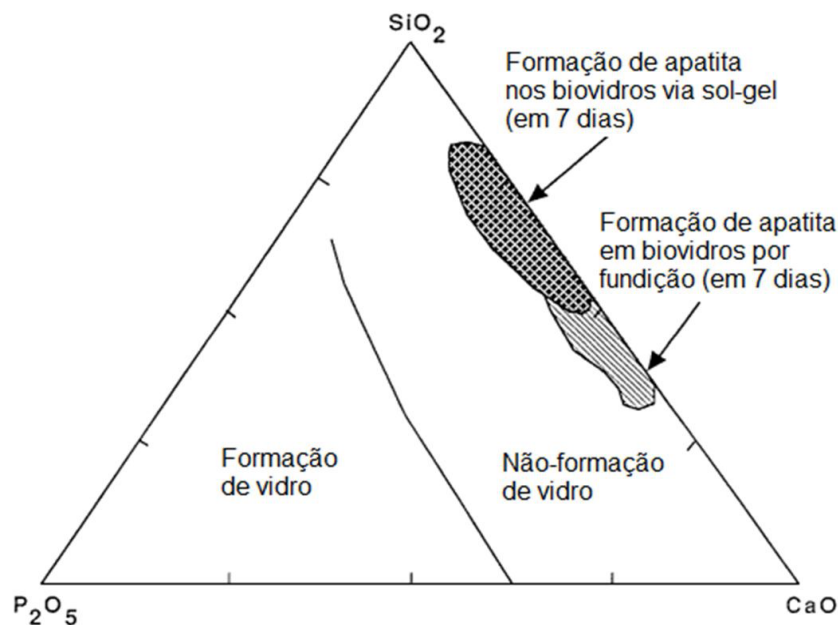
Apesar deste vidro bioativo apresentar 60% mol de SiO_2 , ele é capaz de promover a ligação com tecido ósseo, uma vez que é processado via sol-gel, permitindo a extensão da região de ligação com o osso até composições com 90% de SiO_2 (MOREJON-ALONSO *et al.*, 2012).

Os materiais produzidos via sol-gel além de apresentarem alta bioatividade, até mesmo para 90% em mol de concentração de sílica, apresentam maior velocidade de formação de fosfato de cálcio carbonatado (HCA) em relação aos vidros bioativos produzidos por fundição

convencional. Isso se deve à maior liberação de sílica solúvel a qual promove a nucleação de cristais de hidroxiapatita no material vítreo (MOREJON-ALONSO et al., 2012). Além disso, os produtos resultantes apresentam nano porosidade e elevada superfície de contato em relação ao vidros bioativos denso preparado por fusão (MOREJON-ALONSO et al., 2012).

Na Figura 8 é apresentado o diagrama ternário com a variação das composições de bioatividade dos vidros produzidos via sol-gel em comparação com os vidros produzidos por fundição (NARASARAJU; PHEBE, 1996).

Figura 8 – Composições de bioatividade dos vidros produzidos via sol-gel em relação aos vidros produzidos por fundição.



Fonte: Adaptado de HENCH; WHEELER; GREENSPAN, 1998.

Na metodologia sol-gel, inicialmente são utilizados precursores orgânicos que formam o sol, partículas coloidais (com diâmetro de 1 – 100 nm) dispersas em um líquido. Em seguida, forma-se o gel, rede rígida e interconectada com porosidade submicrométrica e cadeias poliméricas cujo comprimento médio é superior a 1 μm (LUZ; MANO, 2014).

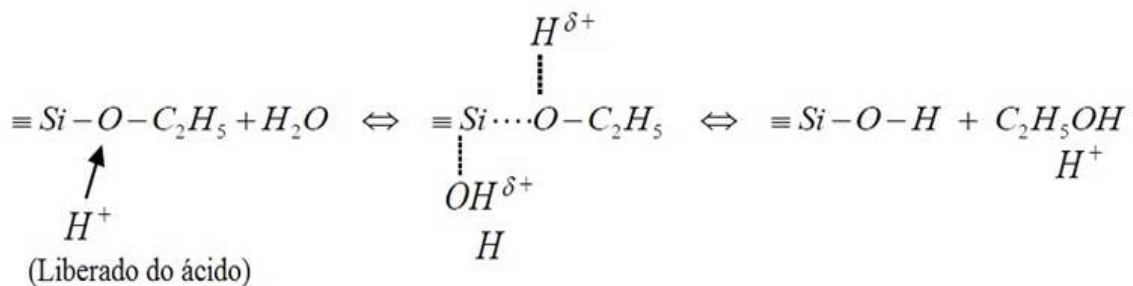
O processo sol-gel é realizado em algumas etapas, as quais são descritas a seguir:

Mistura: o sol é formado por meio da mistura mecânica das partículas coloidais em água; as reações envolvendo o tetraetil ortosilicato (TEOS - fornecedor de silício para a formação do vidro) liberam água e álcool que resultam no início da formação das redes de sílica, as quais mantêm presos em seu interior água e álcool expelidos pela reação do TEOS. Estas reações são

chamadas de hidrólise e poli condensação (equações químicas 4 e 5) e podem ocorrer em diferentes temperaturas.



Gelificação: a gelificação de um sistema pode levar alguns minutos até vários dias, dependendo da sua composição. Em alguns casos, um catalisador para a reação de hidrólise, tal como, ácido nítrico e um catalisador de gelificação, tal como, hidróxido de amônio são adicionados ao sistema permitindo o ajuste do pH e controle das taxas de hidrólise e gelificação. Em condições ácidas, a hidrólise começa por formação rápida de um grupo oxigênio-alquilo protonado uma vez que a concentração de H^+ é alta na solução. Isso torna o silício mais eletrofílico e mais propenso a ser atacado por H_2O . Assim, a reação de hidrólise sob condições ácidas é acelerada como representado abaixo.



Envelhecimento: durante este período as reações de policondensação continuam a ocorrer concomitantemente com a reprecipitação de redes do gel, fator que aumenta a espessura dos pescoços formados entre as partículas e diminui a porosidade.

Secagem: durante a secagem ocorre a remoção do líquido presente nos poros interconectantes da rede; logo este processo deve ser controlado de forma a evitar trincas e falhas no material durante a evaporação da água.

Desidratação ou estabilização química: após esta etapa o sólido se torna ultra poroso e estável quimicamente uma vez que as ligações de silanol são removidas da rede dos poros.

Densificação: os poros são eliminados por meio da exposição do material a altas temperaturas.

Enfim, o processamento de materiais por sol-gel é muito utilizado por: (i) ser realizado a baixas temperaturas; (ii) obter como resultado material com elevadas pureza e homogeneidade; (iii) permitir variar a estrutura do material por meio do controle das reações de hidrólise e policondensação que ocorrem durante a síntese; (iv) ser obtida uma maior bioatividade, possibilitando o controle da mesma pela mudança da composição ou microestrutura; e (v) apresentar grande facilidade de produção de pós (HEJAZIA; AHMADIANA, 2014).

O precursor mais utilizado para a produção de vidro bioativo pelo processo sol-gel é o TEOS, o qual como visto sofre hidrólise em ambiente ácido e é precipitado na forma de partículas quando em ambiente básico. Nitratos de cálcio e ácido nítrico têm sido tradicionalmente utilizados na maioria dos vidros bioativos sintetizados pelo processo sol-gel, devido sua alta solubilidade, baixo custo e facilidade de decomposição térmica.

3.2.3 O papel biológico dos elementos dopantes

A excepcional versatilidade dos vidros bioativos em termos de propriedades físico-químicas e propriedades biológicas depende muito da sua composição, que pode ser direcionada para se obter o efeito desejado, como por exemplo, alta cinética de formação de hidroxiapatita.

Além disso, foi amplamente demonstrado que a adição de modificadores mono e bivalentes (por exemplo, K_2O , Na_2O , CaO e MgO) é útil para ajustar a taxa do processo de bioatividade em vidros a base de silicato e/ou reabsorção de vidros a base de fosfato (HEJAZIA; AHMADIANA, 2014) e que pequenas quantidades de Al_2O_3 (<3 mol%) são úteis para aumentar as propriedades mecânicas dos vidros bioativos (MOLDOVAN *et al.*, 2015).

Além disso, pequenas quantidades de oligoelementos podem ser incorporadas na composição de vidro de modo que, uma vez liberada, possa provocar efeito terapêutico apropriado *in situ*. Uma visão geral dos efeitos biológicos de alguns dos produtos de dissolução iônica liberados de vidros bioativos é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Principais produtos de dissolução iônica liberados de vidros bioativos e seus efeitos terapêuticos (ABUKAWA, 2006).

Elemento	Efeitos
Si	Papel chave nos processos metabólicos, especialmente para a formação e calcificação do tecido ósseo. Estimulação da produção de colágeno tipo I. Promoção de nova vascularização.
Ca	Promoção da proliferação de osteoblastos. Estimulação da angiogênese. Promoção da migração e proliferação de células epidérmicas. Aceleração da coagulação do sangue.
Zn	Efeito anti-inflamatório. Estimulação da formação óssea pela ativação da síntese proteica em osteoblastos.
Mg	Estimulação da nova formação óssea. Promoção da adesão e estabilidade das células ósseas.
Ag	Propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas.
Sr	Tratamento de osteoporose por meio de estimulação da regeneração óssea.

Fonte: O Autor

Estudos indicam que íons de silício e silicato estimulam os osteoblastos ativando famílias de genes envolvidos na osteogênese (ABUKAWA *et al.*, 2006). Cálcio, além de desempenhar um papel ativo no processo de dissolução do vidro, é um constituinte fundamental dos ossos e pode ativar a remodelação dos ossos.

Alta concentração de cálcio ativa receptores especiais que estão presentes nos osteoblastos e nos osteoclastos, mas enquanto nos primeiros os íons de cálcio aumentam a atividade celular, nos últimos os íons de cálcio acabam limitando a atividade das células. Como resultado, o cálcio promove a formação de novos ossos, porém, concentrações muito altas podem ser tóxicas (PENA; AZA, 1999).

O zinco e o magnésio têm quase os mesmos efeitos. Eles podem impedir a reabsorção óssea, estimulando a proliferação e diferenciação de osteoblastos, bem como a capacidade de mineralização óssea. O zinco tem propriedades anti-inflamatórias e tem sido utilizado para a produção de vidro bioativos para uso ortopédico e odontológico (SOUZA *et al.*, 2018).

O estrôncio (Sr), é um elemento traço originalmente encontrado em minas de chumbo perto de Strontian (Escócia) no final dos anos 1700, e foi isolado em 1880. É encontrado nos

compostos minerais celestita (SrSO_4) e Estroncianita (SrCO_3), que estão presentes no solo e na água potável (HENKEL *et al.*, 2013).

O estrôncio (Sr) dentro da biologia e patologia humana sempre atraiu menor interesse que os outros dois metais divalentes, cálcio e magnésio também pertencentes à família dos metais alcalinos terrosos. Durante anos foi objeto de estudo acadêmico sem despertar grande interesse em estudos clínicos. Este cenário tem sofrido modificações devido ao interesse crescente do papel biológico do Sr após o desenvolvimento de medicamentos a base desse elemento, que tiveram sua eficiência comprovada na redução de incidência de fraturas em pacientes com osteoporose.

O estrôncio, como o cálcio, é um agente que tem afinidade pelo osso. Está naturalmente presente no fígado, músculos e fluidos fisiológicos, e principalmente presente no osso, correspondendo a 3,5% do teor de cálcio. É preferencialmente encontrado em ossos jovens e em maior quantidade no tecido ósseo esponjoso do que no cortical.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram efeito estimulatório do Sr sobre os osteoblastos e efeitos inibidores sobre os osteoclastos, associado a um aumento da densidade e resistência.

A crescente evidência dos efeitos benéficos do estrôncio no tecido ósseo justifica a crescente interesse na incorporação da Sr nos biomateriais para reparação de tecido duro (HENKEL *et al.*, 2013).

Experimentos pioneiros com animais mostraram que os sais de estrôncio podem diminuir a reabsorção óssea e aumentar a massa e a formação óssea sem afetar a mineralização óssea, aumentando a possibilidade de que o estrôncio realmente apresente potencial para o tratamento da osteoporose.

Além de sua analogia química com o Ca, o Sr é um elemento que tem afinidade pelo osso (“bone seeking”) e 98% do conteúdo total de Sr do corpo pode ser encontrado no esqueleto. Após a administração do sal Sr, este elemento passa através das paredes dos capilares do tecido ósseo por difusão para alcançar o fluido extracelular ósseo e, finalmente, se deposita no osso, sendo adsorvido na superfície da apatita óssea ou substituindo o Ca nos cristais ósseos. O Sr^{+2} , apresenta raio iônico (1,13 Å) maior que o do Ca^{+2} (0,99 Å), sendo assim, sua incorporação aos cristais ósseos leva a um comprimento da ligação hidroxila-Sr maior que o do Ca-hidroxila. Isso, por sua vez, resulta em uma diminuição na energia da rede, que é inversamente proporcional à distância de ligação e, portanto, uma diminuição subsequente na cristalinidade.

Assim, a incorporação de Sr ao mineral ósseo pode levar a modificações nos parâmetros de rede, tamanho do cristal e cristalinidade do mineral ósseo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

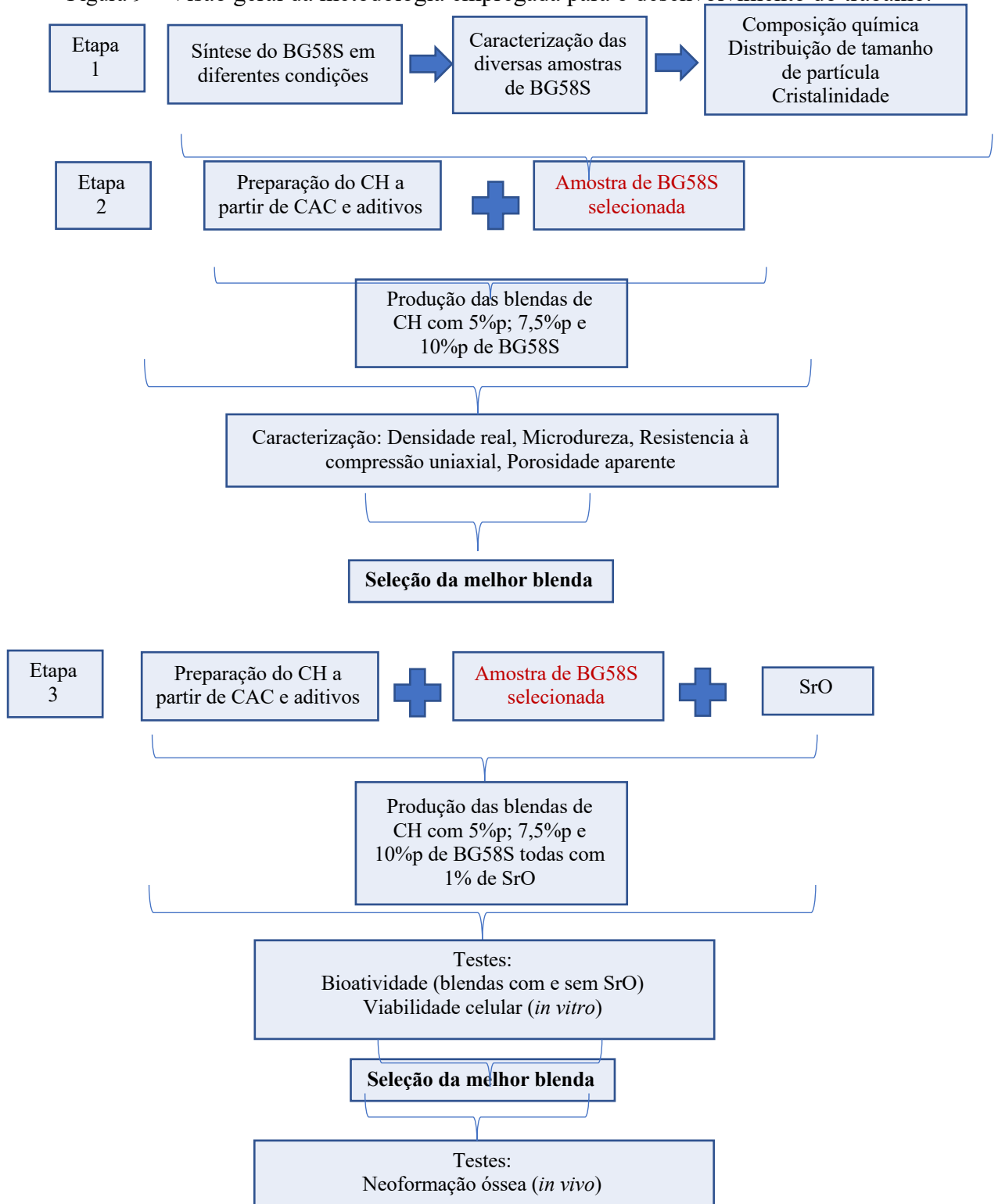
O desenvolvimento deste trabalho relativo à síntese e caracterização do vidro bioativo (BG58S) e de suas blendas com cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo ou não óxido de óxido de estrôncio (SrO), assim como as suas caracterizações físico-químicas e de bioatividade foram realizados no Laboratório de Cerâmicas Avançadas e na Central Analítica Multiusuário do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

Os experimentos de viabilidade celular (*in vitro*) foram realizados na Faculdade de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) e na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto.

Os testes biológicos *in vivo* foram Realizados na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, no Instituto de Tecnologia, Campus de São José dos Campos.

Para facilitar a compreensão da metodologia de estudo aplicada neste trabalho, a Figura 9 apresenta um esquema simplificado das diversas etapas desenvolvidas durante a realização desse trabalho. Posteriormente, haverá o detalhamento de cada uma dessas etapas.

Figura 9 – Visão geral da metodologia empregada para o desenvolvimento do trabalho.



4.1 Síntese do vidro bioativo – BG58S

O vidro bioativo (BG-58S), de composição ternária $58\text{SiO}_2\text{-}33\text{CaO-}9\text{P}_2\text{O}_5$ (%-p) foi preparado empregando-se reagentes de alta pureza. As fontes precursoras dos respectivos

óxidos de silício (Si), cálcio (Ca) e fósforo (P) utilizadas foram respectivamente: Tetraethylorthosilicate, TEOS, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$); nitrato de cálcio tetrahidratado, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, e Trietilfosfato, TEP, $\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ ou Ácido fosfórico, AF, H_3PO_4 . O solvente utilizado na síntese foi o álcool etílico absoluto, $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$; para a catálise da reação de hidrólise, uma solução de ácido nítrico 2M foi utilizada e uma solução de hidróxido de amônio 1M como catalisador da gelificação. As demais informações referentes aos reagentes empregados na síntese são apresentadas na Tabela 4.

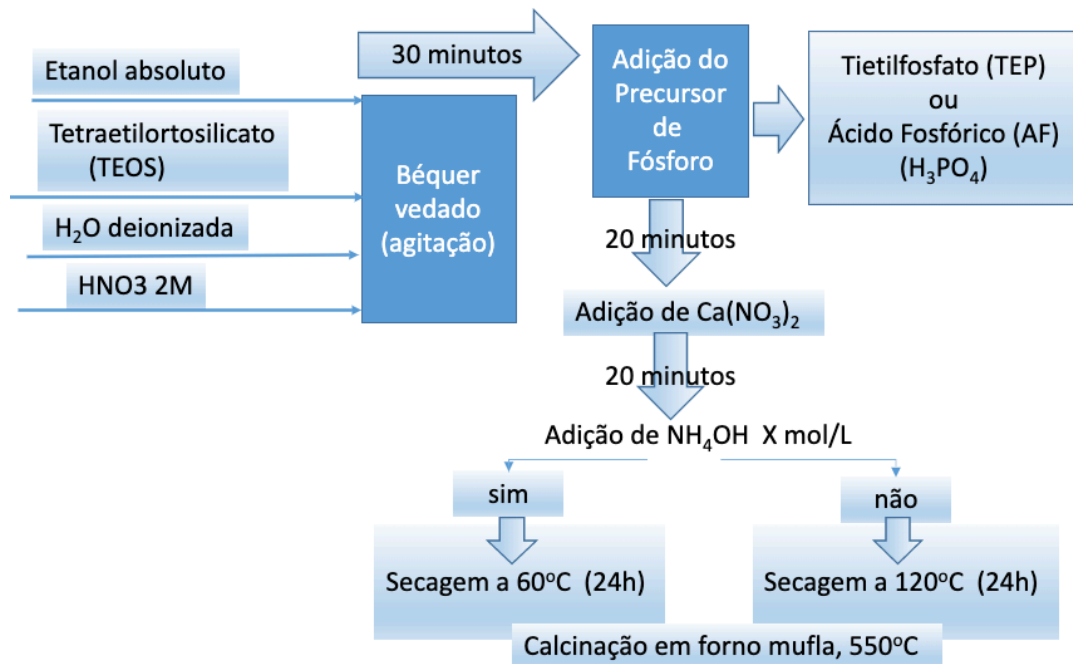
Tabela 4 - Informações técnicas dos reagentes utilizados para a síntese do BG58S.

Reagente	Massa molar (g/mol)	Massa específica (g/cm³)	% Pureza	Fornecedor
TEOS	208,33	0,93	98	Sigma
Ca(NO₃)₂ · 4H₂O	236,15	1,90	99	Synth
TEP	182,15	1,07	99	Sigma
AF	98,00	1,71	85	Synth
C₂H₅O	46,07	0,79	99,8	Neon
HNO₃	63,00	1,40	65	Química Moderna
NH₄OH	35,05	0,90	28-30	Gold

A síntese do BG-58S foi realizada empregando a técnica sol-gel à temperatura ambiente. O processo envolveu reações de hidrólise e policondensação utilizando quantidades estequiométricas de TEOS, nitrato de cálcio tetrahidratado e TEP ou AF, obedecendo a composição nominal do BG 58S: 58% SiO_2 , 33% CaO , 9% P_2O_5 (% p).

A Figura 10 apresenta um esquema simplificado das etapas da síntese do BG58S e na sequência há uma descrição detalhada de cada fase do processo. As condições de síntese estudadas são apresentadas na Tabela 4.

Figura 10 – Etapas da síntese do vidro bioativo de acordo com as condições da Tabela 4.



Fonte: O autor.

Todo o processo de síntese ocorreu em um béquer de vidro, vedado com filme plástico, que permaneceu sob agitação magnética durante as etapas de síntese, as quais são descritas a seguir:

Etapa I: em um béquer de 400 mL de capacidade, foram adicionados 50 mL de etanol absoluto, 45,9 mL de água destilada, 22 mL de TEOS e 2,8 mL de solução de ácido nítrico 2M. A razão molar água/TEOS empregada foi variada e será justificada mais adiante neste trabalho. A solução foi mantida sob agitação magnética por 30 minutos.

Etapa II: Após 30 min de agitação foram adicionados 2,2 mL de TEP ou 1,0 mL de AF e a agitação magnética foi mantida por 20 minutos;

Etapa III: na sequência, foram adicionados 14,04 g de nitrato de cálcio tetrahidratado e a agitação magnética foi mantida por 20 minutos, até que o nitrato de cálcio fosse totalmente dissolvido;

Etapa IV: após a completa dissolução do nitrato de cálcio, foram adicionados ou não 10 mL solução de hidróxido de amônia (1M ou 2M) mantendo-se agitação magnética vigorosa, até o início da gelificação quando, a agitação magnética foi substituída pela agitação com um bastão de vidro. O BG sintetizado foi colocado em uma placa de petri e levado à estufa para secagem a 60°C, por 24 horas, para que a água residual e o álcool fossem eliminados.

Etapa V: O BG seco foi macerado em almofariz e na sequência calcinado em forno tipo mufla, a 550 °C, durante duas horas com rampa de aquecimento igual a 3 °C/min.

Etapa VI: Depois de calcinado, o pó de BG foi novamente macerado em almofariz e caracterizado quanto à sua distribuição de tamanho de partículas, cristalinidade e composição química.

Foi realizado um estudo sistemático para a definição dos parâmetros de síntese para a obtenção do vidro bioativo (BG58S) mais adequado para ser misturado ao cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH). Diversas condições de síntese foram avaliadas e são apresentadas na Tabela 5.

Este estudo envolveu a variação da Razão Molar (R) (Água/TEOS), a mudança do precursor de fósforo (TEP ou AF) em diferentes concentrações (1M ou 2M), o uso de um agente de gelificação (NH₄OH), com diferentes concentrações (1M ou 2M) para diminuir o tempo de formação do gel e, também, a ausência desse agente gelificante no processo.

A variação dessas condições de síntese teve como meta a obtenção do vidro bioativo (BG58S) com composição química mais próxima possível da composição nominal, tamanho de partícula menor que o das partículas do CH e baixa cristalinidade.

De acordo com a literatura (DESHMUKH *et al*, 2020) o aumento da razão de Razão Molar (R) Água/TEOS é um fator determinante o tamanho das partículas do BG58S, porém, razões maiores que 13 podem levar à diminuição da velocidade da reação de forma significativa. A ideia de se empregar o ácido fosfórico (AF) como agente precursor foi uma tentativa para minimizar o custo na obtenção do BG58S, já que o trietilfosfato (TEP) é um reagente de elevado valor comercial. O uso de um acelerador de geleificação (NH₄OH) é bastante interessante porque diminui drasticamente o tempo de formação do gel, de horas para apenas poucos minutos.

Tabela 5 - Condições das diversas sínteses realizadas para obtenção do vidro bioativo BG58S.

Amostras	Precursor de Fósforo	Razão (R) Água/TEOS	Adição NH ₄ OH	Secagem
TEP-SA	TEP	7,85	-	120°C/24h
TEP-1M	TEP	7,85	1 M	60°C/24h
TEP-2M	TEP	7,85	2 M	60°C/24h
TEP-2M (R13)	TEP	13	2M + ultrassom	60°C/24h
AF-SA	H ₃ PO ₄	7,85	-	120°C/24h
AF-1M	H ₃ PO ₄	7,85	1 M	60°C/24h
AF-2M	H ₃ PO ₄	7,85	2 M	60°C/24h
AF-2M (R13)	H ₃ PO ₄	13	2 M + ultrassom	60°C/24h

Fonte: o Autor

4.2 Caracterização do vidro bioativo

Os pós de vidro bioativo (BG58S) produzidos por rota sol-gel, segundo as condições indicadas na Tabela 4, foram caracterizados quanto a:

4.2.1 Distribuição de tamanho de partículas

Os pós de BV-58S resultantes foram caracterizados quanto à distribuição de tamanho de partículas usando um analisador S3550 (Microtrac).

4.2.2 Difração de raios X

A caracterização quanto à presença de fases cristalinas foi realizada por meio da técnica de Difração de Raios X com o equipamento Difrátômetro de Raios X (Shimadzu: XRD-6100), varredura 2θ de 10 a 80° a partir de uma fenda de 0.3.

4.2.3 Composição química

A composição química dos pós de vidro bioativo (BG58S) produzidos foram avaliadas por meio da aplicação da técnica de espectrometria de raios X por dispersão de energia (EDS).

4.3 Preparação das blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) e vidro bioativo (BG58S) sem e com óxido de estrôncio (SrO)

Após a obtenção e caracterização dos pós de BG58S obtidos pela rota sol-gel, de acordo com as condições apresentadas na Tabela 4, foi selecionada a amostra de vidro bioativo que apresentou melhores resultados quanto à composição química, distribuição de tamanho de partícula e cristalinidade, para a formação das blendas com cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH).

4.3.1 Blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) e vidro bioativo (BG58S) sem óxido de estrôncio (SrO)

Inicialmente, foi preparado o CH por meio da mistura a seco de cimento de aluminato de cálcio (CAC) com dispersante poliglicol (Bayer, 0,6%-p) e plastificante $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Labsynth, 2,8%-p). A mistura preparada foi colocada em moinho de bolas para a homogeneização durante 1 hora.

A seguir, foram adicionados ao CH, diferentes teores (5, 7,5 e 10%-p) de BG58S e as misturas foram homogeneizadas durante 1 hora empregando-se o moinho de bolas. Após essa operação, foram obtidos os seguintes grupos: (1) CH; (2) CH5BG (CH-5 p%BG58S); (3) CH-7,5BG (CH7,5 p% BG58S) e (4) CH-10BG (CH-10 p% BG58S).

As misturas foram utilizadas para preparar suspensões aquosas contendo 75% de sólidos e moldar corpos de prova cilíndricos (diâmetro = 6 mm e altura = 2 mm) para análises de densidade teórica e microdureza. Outro conjunto de amostras (diâmetro = 16 mm e altura = 18 mm) foram moldadas para testes de resistência à compressão uniaxial, porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros. As amostras foram curadas em atmosfera saturada a 37 °C durante 5 horas e depois caracterizadas.

As misturas também foram utilizadas para preparar suspensões aquosas contendo 73%, 74% e 75% em peso de sólidos as quais foram caracterizadas quanto à viscosidade, injetabilidade e trabalhabilidade.

4.3.2 Blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH), vidro bioativo (BG58S) com óxido de estrôncio (SrO)

Na sequência do trabalho, foram preparadas as blendas que além do CH e diferentes teores do BG58S, incluem em sua composição 1%p de óxido de estrôncio (SrO, 99,9%, Sigma-Aldrich) resultando nos grupos adicionais: (5) CH-5BG/Sr (CH-5%p de BG58S-1%p de SrO); (6) CH-7,5BG/Sr (CH-7,5%p de BG58S-1%p de SrO) e (7) CH-10BG/Sr (CH-10% p de BG58S-1%p de SrO). Todos os grupos foram utilizados para preparar suspensões aquosas contendo 75% em peso de sólidos e moldadas em moldes cilíndricos (diâmetro = 6 mm e altura = 2 mm) para avaliação da bioatividade enquanto suas misturas de pó seco foram previamente esterilizadas a 120 °C por 2 horas e utilizadas em testes de viabilidade celular.

4.4 Caracterização das blendas de CH-BG58S sem e com óxido de estrôncio (SrO)

4.4.1 Caracterização das blendas de CH-BG58S sem óxido de estrôncio (SrO)

4.4.1.1 Densidade teórica ou real das amostras

A densidade teórica ou real das amostras, previamente secas a 110 °C por 24 horas, foi avaliada pela técnica de picnometria com hélio (Ultracyc 1200e, V5.04). Os valores de densidade foram expressos como a média de vinte medidas tomadas de cada mistura.

O picnômetro de hélio é constituído por duas câmaras de volumes conhecidos (por calibração prévia): a câmara onde se coloca a amostra e a câmara de expansão, ligadas por uma válvula (válvula de expansão). Pressuriza-se a câmara que contém a amostra até uma pressão P_1 (cerca de 17 psig). Seguidamente, a válvula de expansão é aberta e, em consequência, ocorre um abaixamento de pressão para P_2 . O volume do sólido é calculado a partir da seguinte equação 6:

$$P_1 (V_a - V_s) = P_2 (V_a - V_s + V_e) \quad (6)$$

onde: $V_s = V_a - V_e / (P_1/P_2 - 1)$, sendo: V_a - volume da câmara da amostra; V_e - volume da câmara de expansão; V_s - volume do sólido.

A massa volúmica é automaticamente calculada pelo aparelho, através da relação entre a massa do sólido (introduzida como dado de entrada) e o volume (V_s) derivado da equação acima. A principal vantagem deste método reside na sua capacidade para medir apenas o volume da substância, ou seja, descontar ao volume total da amostra todos os poros (a menos que estes sejam fechados ou inacessíveis ao gás).

4.4.1.2 Microdureza

O teste de microdureza foi realizado em Vickers FV-100e utilizando amostras secas a 110 °C por 24 horas. Os valores de microdureza foram expressos como a média das cinco indentações de cada amostra utilizando cargas de 98,07 N.m.

As amostras foram posicionadas abaixo do penetrador e iniciou-se o teste, sendo repetida por cinco vezes, em regiões próximas ao seu centro. Após a remoção da carga, foi medido o valor das diagonais da impressão produzida no material por meio de um micrometro acoplado a um microscópio. Desta forma foi calculada a área da superfície impressa pela medição das diagonais, quando o Número Vickers (HV) é determinado pela razão entre a carga (F) e a área superficial da impressão (A, mm²), por meio da equação 7.

$$HV = \frac{F}{A} = \frac{2 \cdot F \cdot \sin \frac{136^\circ}{2}}{d^2} \approx 1,8544 \frac{F}{d^2} \quad (7)$$

sendo F é a carga aplicada sobre a amostra (N.m); d é a soma das diagonais dividido por dois; HV = dureza Vickers (kgf/mm²).

4.4.1.3 Resistência mecânica à compressão uniaxial

Para o ensaio de caracterização correspondente à resistência à compressão uniaxial, as amostras foram submersas em solução de fluido corporal simulado (SBF) e mantidas por 7 dias a 37°C e, a depois ensaiadas úmidas.

A preparação da solução SBF empregada seguiu o procedimento descrito na literatura por Rigo *et al* (2004) e seus componentes e respectivas quantidades são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 -Reagentes usados na preparação de um litro de solução de fluido corporal simulado (SBF) de acordo com Rigo.

Reagente	SBF 1,5 Rigo
Água	400 mL
NaCl	11,992 g
NaHCO ₃	0,529 g
KCl	0,335 g
K ₂ HPO ₄	0,261 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,458 g
HCl 0,1M	15 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,551 g
Na ₂ SO ₄	0,107 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ 0,05M	Teor necessário para ajuste pH= 7,25
HCl 0,1M	Teor necessário para ajuste pH= 7,25

Fonte: O autor

A resistência à compressão uniaxial (ISO 9917-1) foi medida usando uma máquina de ensaios EMIC DL10000, com velocidade de deslocamento de 0,15 mm/min em pelo menos cinco amostras de cada composição. A tensão de ruptura σ_R (MPa) foi calculada de acordo com a Equação 8.

$$\sigma_R = \left[\frac{4P}{\pi D^2} \right] \quad (8)$$

sendo P (N) é a carga máxima requerida para fraturar cada amostra e D (mm) é o diâmetro médio das amostras.

4.4.1.4 Porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros

As amostras, depois de desmoldadas, foram secas a 110°C por mais 24 horas após o período de cura. Medidas de porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros foram realizadas em materiais secos, que foram classificados como testes “sem tratamento em SBF”. Outras amostras cilíndricas foram colocadas em contato com solução de fluido corporal simulado (SBF) a 37°C por 7 dias. Após este período, as amostras foram secas 110 °C por 24 h e sua porosidade aparente e distribuição de tamanho de poros foram avaliados e denominados como “com tratamento em SBF”.

A porosidade aparente foi avaliada de acordo com o método de imersão (princípio de Arquimedes), usando querosene como líquido de imersão (ASTM C830). As amostras em triplicata foram inicialmente pesadas a seco (M_s) e após 1 hora de imersão em querosene ($\rho=0.80\text{g/cm}^3$) sob vácuo, as amostras foram novamente pesadas quando imersas no líquido (M_i) e úmidas (M_u). Assim, a porosidade aparente foi calculada pela massa de líquido retida em seus poros abertos por meio da Equação 9.

$$PA = \left[\frac{(M_u - M_s)}{(M_u - M_i)} \right] \times 100 \quad (9)$$

A distribuição de tamanho de poros foi medida por meio da técnica de porosimetria de intrusão de mercúrio (Autopore IV 9500, Micromeritics). A técnica é baseada na equação de Washburn, sendo D é o diâmetro do poro, P é a pressão aplicada, γ é a tensão superficial do mercúrio e ϕ é o ângulo de contato (130°) entre o mercúrio e a amostra. O volume de mercúrio (V) que penetra os poros é medido diretamente em função da pressão aplicada (P) como descrito pela Equação 10.

$$D = 4\gamma P^{-1} \cos(\phi) \quad (10)$$

4.4.1.5 Viscosidade, trabalhabilidade e injetabilidade

Os ensaios de viscosidade e trabalhabilidade usando as suspensões aquosas das diferentes misturas foram realizados em um reômetro Viscotester iQ Air HAAKE, sendo a viscosidade

caracterizada por meio de medidas rotacionais a uma temperatura de 25 °C, enquanto a trabalhabilidade foi realizada a 37° C por meio de medidas oscilatórias.

Para os ensaios de injetabilidade foram utilizadas seringas hipodérmicas descartáveis de 5 mL e agulhas hipodérmicas de 1.6 mm de diâmetro x 40 mm de comprimento (16G x 1 1/2”) (Abdala 2018). Os resultados de injetabilidade foram obtidos por meio de uma expressão matemática, onde se utilizam os valores da seringa vazia (M_0), da seringa preenchida (M_1) e da seringa após a injeção (M_2), como mostrado na Equação 11:

$$Injetabilidade(\%) = \left[\frac{(M_1 - M_0) - (M_2 - M_0)}{(M_1 - M_0)} \right] \cdot 100 \quad (11)$$

4.4.1.6 Bioatividade

Os testes de bioatividade, foram realizados para amostras em duplicata de cada uma das blendas produzidas sem e com óxido de estrôncio (SrO) para que fosse possível fazer um estudo comparativo a respeito da intensificação da bioatividade estimulada pela inserção do óxido de estrôncio nas blendas. As amostras foram previamente esterilizadas a 110 °C por 2 h. Na sequência foram acondicionadas em recipientes de polietileno e imersas em 19 mL de solução SBF. Os recipientes contendo as amostras foram mantidos continuamente agitados a 100 rpm a 37,0 °C, empregando-se um shaker incubador (MA420, Marconi) durante 1, 7 e 15 dias. Em seguida, as amostras foram filtradas e lavadas com água deionizada e acetona para remover a solução e interromper qualquer reação superficial. Logo após a secagem em temperatura ambiente por 3 dias, as amostras foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM, EVO MA10 Zeiss) com análise de energia dispersiva de raios X (EDS), difração de raios X (XRD-6000, Shimadzu), infravermelho com transformada de Fourier espectroscopia (FTIR, PerkinElmer, Spectrum 400) na faixa de 2000 a 450 cm^{-1} , antes e após imersão em SBF. Uma razão de área de superfície para volume de 0,1 cm^{-1} foi mantida para todas as imersões, e as soluções de SBF não foram trocadas durante os experimentos.

A solução SBF é frequentemente utilizada e indicada para avaliações *in vitro* da formação de camadas superficiais de apatita em materiais de acordo com a ISO 23317/2014.

4.4.2 Caracterização das blendas de CH-BG58S com óxido de estrôncio (SrO)

4.4.2.1 Cultivo celular

Células MC3T3-E1, semelhantes a osteoblastos (subclone 14, CRL-2594, American Type Culture Collection - ATCC, Manassas, VA, EUA) foram descongeladas e cultivadas em frascos de 75 cm² (Corning Inc., Corning, New York, NY, EUA) com meio de cultura, composto por α -MEM (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Invitrogen) e 100 UI/mL-100 μ g/mL penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich). Após a subconfluência, as células foram contadas e plaqueadas a uma densidade de 10.000 células / cm² diretamente em poços de placa de poliestireno (Corning Inc.) e cultivadas em meio osteogênico (composto de meio de cultura mais 7mM -glicerofosfato e 50 μ g / mL de ácido ascórbico) e deixada aderir por 24 horas antes da exposição ao extrato das composições sob avaliação. Durante todo o período de cultivo, as células foram mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, sendo os meios de cultura trocados a cada 3 dias.

4.4.2.2 Testes de cultura celular

0,2 cm³ do pó referente à cada composição das blendas e CH puro foram utilizados para preencher o fundo dos 24 poços de uma placa e, após o assentamento inicial, as amostras foram condicionadas com 1,9 mL de meio osteogênico livre de soro (1 mL/cm²) por 24 horas, na temperatura de 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% do ar atmosférico. Após esse período, o meio de cultura utilizado para o condicionamento foi coletado, filtrado e armazenado a -20°C até o uso nos experimentos. Para a exposição das culturas de células, o extrato de cada uma das composições foi descongelado à temperatura ambiente e diluído nas proporções de 50; 25 e 12,5% em meio osteogênico, sendo adicionado soro fetal bovino (Invitrogen) na concentração final de 10%. As culturas expostas apenas ao meio osteogênico serviram como controle. Após 3 dias, a viabilidade celular foi avaliada qualitativamente usando o kit comercial Live/Dead (Viabilidade/Citotoxicidade, para células de mamíferos, Molecular Probes Inc, Eugene, OR, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As células viáveis foram marcadas com fluorescência verde pela reação da calceína (C₃₀H₂₆N₂O₁₃) com esterases intracelulares, enquanto as células mortas foram marcadas com fluorescência vermelha pela ligação do homodímero-1 de etídio (EthD-1) aos ácidos nucleicos expostos com a ruptura das membranas celulares (Morte celular). As imagens foram obtidas em microscópio invertido

trilocular, por fluorescência direta (Led B-G-U-UV Trinocular, Digilab, Piracicaba, SP, BR), com câmera digital Nikon acoplada.

A viabilidade/citotoxicidade também foi avaliada quantitativamente por meio da atividade mitocondrial após 48 e 72 horas de exposição aos pós das amostras, usando o ensaio colorimétrico MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazolio]} (Sigma-Aldrich), um sal que é reduzido pelas proteinases mitocondriais, ativo apenas em células viáveis. Alíquotas de MTT com 5 mg / mL em PBS foram preparadas e as culturas primárias foram então incubadas com esta solução a 10% em meio de cultura por 4 horas a 37 ° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1 mL de PBS aquecido. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácida (100 mL de isopropanol e 134 µL de HCl) a cada poço sob agitação durante 5 min, para solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200 µL foram removidas dos poços e transferidas para uma placa de 96 poços para medição colorimétrica em um espectrofotômetro (570 nm; µQuanti, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

Aos 7 dias, foi realizado um teste para avaliação qualitativa da atividade ALP, empregando marcador Fast Red. O meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução de PBS (solução salina tamponada com fosfato, Invitrogen) aquecida a 37 °C. Foi adicionado 1 mL / poço de solução tampão Tris 120 mM (Sigma-Aldrich) com pH 8,4, contendo 1,8 mM Fast Red TR (Sigma-Aldrich), 0,9 mM naftol-ASM-X-fosfato (Sigma-Aldrich) e 1:9 de dimetilformamida (Merck KGaA, Darmstadt, HE, DE) e as placas foram mantidas por 30 min em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As imagens foram obtidas em microscópio invertido trilocular, por fluorescência direta (Led BGU-UV Trinocular, Digilab, Piracicaba, SP, BR), com câmera digital Nikon acoplada.

Aos 14 dias, as culturas foram lavadas em solução de PBS (Invitrogen), fixadas em álcool etílico 70% a 4°C por 60 min e lavadas em PBS (Invitrogen) e água bidestilada. Posteriormente, foram corados com vermelho de Alizarina 2% (Sigma-Aldrich), pH 4,2 à temperatura ambiente (RT) por 15 minutos, novamente lavados com PBS (Invitrogen), água deionizada e as placas foram deixadas secar em temperatura ambiente (≈ 25 °C). As imagens macroscópicas dos poços foram obtidas em um estereomicroscópio MZ6 (Leica, Wetzlar, LD, DE), em aumento final de 8X, usando uma câmera DC300 F (Leica) com resolução de 1,3 Mega Pixel. A quantificação bioquímica da mineralização foi realizada pelo método colorimétrico, em que 360 µL de ácido acético a 10% foram adicionados a cada poço e a placa foi levada ao agitador por 30 min em temperatura ambiente (≈ 25 °C). O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos Eppendorf

(Eppendorf, Hamburg, HA, DE) e posteriormente aquecido a 85 °C por 10 min e, posteriormente, mantido em gelo por 5 min. Os tubos foram centrifugados a 10.500 rpm, a 23 °C, por 15 min. Em seguida, 100 µL do sobrenadante, formado após o processo de centrifugação, foram transferidos para um novo conjunto de tubos Eppendorf (Eppendorf). Em seguida, 40 µL de hidróxido de amônio a 10% foram adicionados para neutralizar o ácido, e todo o conteúdo (140 µL) foi transferido para uma placa de 96 poços (Corning Inc.). A absorvância foi medida usando um espectrofotômetro (405 nm, Epoch 2).

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls, quando apropriado ($\alpha = 5\%$), analisados por meio do SigmaPlot (Systat Software Inc., SJ, EUA).

4.4.2.3 Avaliação de neoformação óssea

Para esta etapa do trabalho os grupos experimentais avaliados foram: a) Grupo CH, b) Grupo CH-7,5BG (CH7,5 p% BG58S), c) Grupo CH-7,5BG/Sr (CH-7,5%p de BG58S-1%p de SrO). Os materiais foram usados na forma de uma pasta injetável contendo 74%-p de sólidos.

4.4.2.3.1 Procedimento cirúrgico

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA) aprovado sob o número 19/2020. Esse trabalho também seguiu as diretrizes preconizadas pelo *ARRIVE* (Animal Research Reporting of In Vivo Experiments) (Percie Du Sertid et al., 2020).

Nove ratos *Wistar*, com 90 dias e pesando cerca de 300g, foram usados neste estudo. Os animais provenientes do Biotério Central da Unesp, situado em Botucatu, permaneceram durante o experimento no Biotério do ICT/UNESP em gaiolas onde receberam água e ração *ad libitum*. O ambiente foi cuidadosamente monitorado para manter a temperatura em torno de 20°C e a umidade em 55%. Os testes foram iniciados após 15 dias de adaptação ao ambiente, com ciclos diários alternando 12 horas correspondentes ao período de luz e ao período noturno.

Previamente à cirurgia, os animais foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal pela combinação dos fármacos cloridrato de xilazina 10 mg/kg (Anasedan[®] - Vetbrands, Jacareí - Brasil), substância sedativa e relaxante muscular; e Cloridrato de Ketamina 100 mg/kg

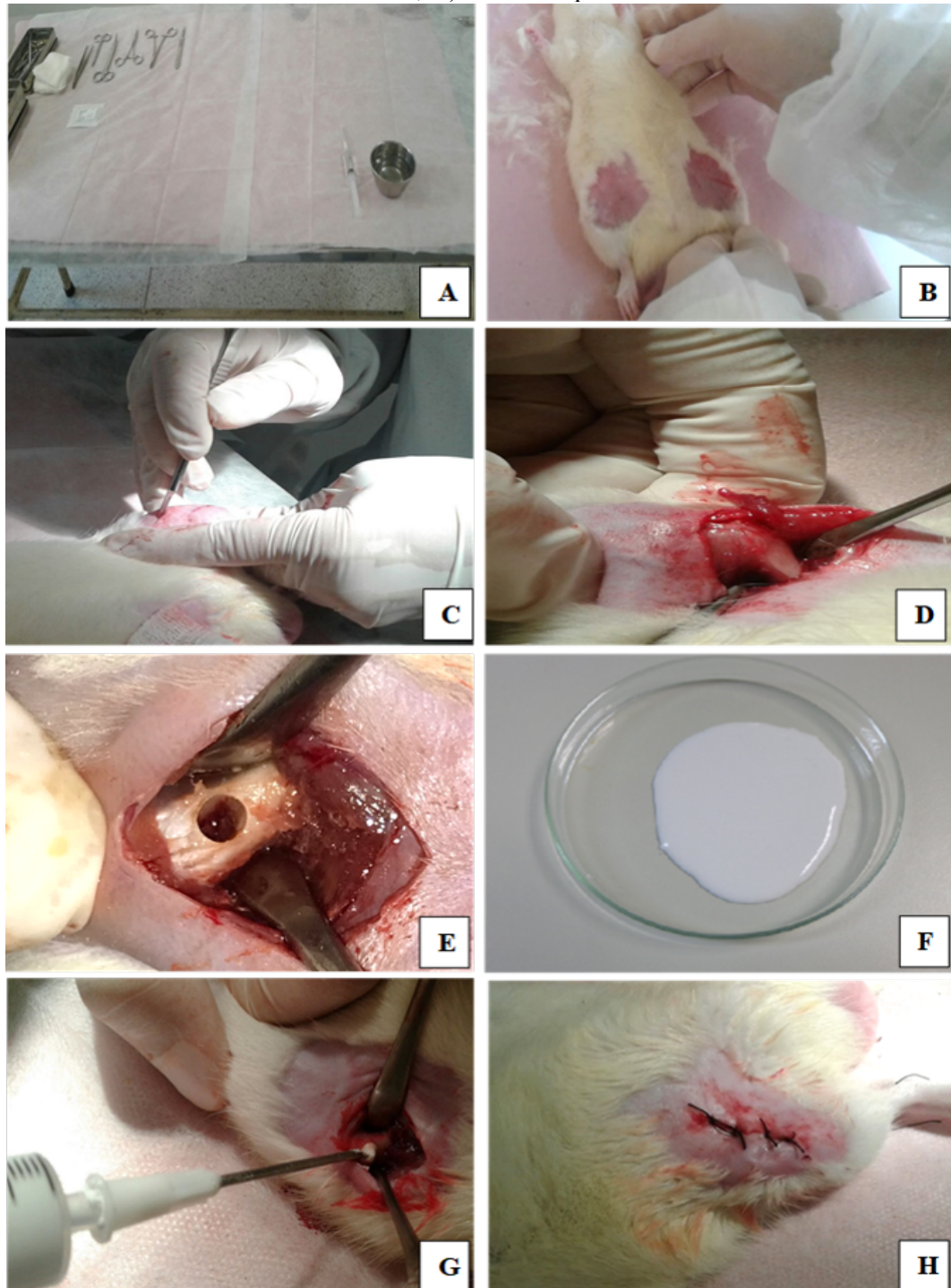
(Dopalen[®] – Vetbrands, Jacaréi - Brasil) de acordo com o Guia de Procedimentos do Biotério – ICT/UNESP.

Após a anestesia dos animais, os locais cirúrgicos dos fêmures direito e esquerdo foram submetidos à tricotomia e à antissepsia com solução de álcool iodado. A incisão foi realizada com lâmina de bisturi número 15 na região correspondente a face medial destes. Os tecidos foram divulsionados para expor a cortical onde foi realizado o defeito crítico com broca cilíndrica de 4,0 mm sob irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, visando evitar o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso. Os animais foram subdivididos sendo que 3 ratos no total de 6 defeitos foram preenchidos por cada grupo de biomaterial estudado. O material de preenchimento foi escolhido aleatoriamente pelo método de sorteio e o animal foi marcado.

Após o preenchimento, os tecidos foram reposicionados e suturados com fio de seda n° 4 (Ethicon/Johnson & Johnson). Novamente foi realizada antissepsia com álcool iodado. Ao término da cirurgia, foi administrado um fármaco analgésico cloridrato de tramadol, 8-10 mg/kg, por via oral, a cada 12 h, durante 05 dias após a cirurgia. Foi administrado também o antibiótico Pentabiótico 0,01 mL/ 100g via intramuscular, imediatamente após a cirurgia e após 5 dias. Após a cirurgia, os ratos foram colocados em gaiolas, com ração e água *ad libitum*, em ambiente com exaustão de ar, e monitorados até o prazo da eutanásia de 4 semanas.

O método de eutanásia foi por meio de dose excessiva da solução anestésica, na qual foi administrada tripla dose da solução anestésica anteriormente citada via intramuscular, seguida de guilhotina. Após a eutanásia, os fêmures foram acondicionados por um período mínimo de 48 horas no formol. A Figura 11 apresenta as etapas do procedimento cirúrgico.

Figura 11– Procedimento cirúrgico: A) mesa cirúrgica; B) tricotomia da região; C) incisão; D) fêmur direito exposto com os tecidos divulsionados; E) defeito ósseo confeccionado; F) cimento preparado; G) injetabilidade do cimento no defeito ósseo; H) Tecidos reposicionados e suturados



Fonte: elaborada pelo autor.

4.4.2.3.2 *Análise histológica e histomorfométrica*

As amostras foram preparadas para análise histológica convencional pelo método de descalcificação após o período mínimo de fixação da peça no formol a 10% por 48 horas. A seguir, as amostras foram colocadas no ácido fórmico a 20% por cerca de 40 dias para que ocorresse a descalcificação. Posteriormente foram lavadas em água corrente por 20 minutos, e submetidas a concentrações crescentes de álcool (70%, 90% e 100%), em seguida foram imersas em xilol para o processo de diafanização. Finalmente as peças, previamente identificadas, foram incluídas em parafina utilizando moldes individuais. Posteriormente, as peças foram submetidas a cortes semi-seriados de 5 µm com o micrótomo automático, situado no laboratório Centro de Biociências Aplicado a Pacientes com necessidades Especiais (CEBAPE) no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (ICT / Unesp). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, e para finalização foram selados com *entellan* e lamínula no Laboratório de Tecido Ósseo, também situado no mesmo Instituto e Departamento.

A análise histomorfométrica foi realizada utilizando imagens de cortes histológicos realizados na área do defeito ósseo na qual houve a inserção do biomaterial. O *software Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, MD) foi utilizado para quantificar a proliferação de tecido ósseo na interface com o biomaterial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Vidro bioativo BG58S

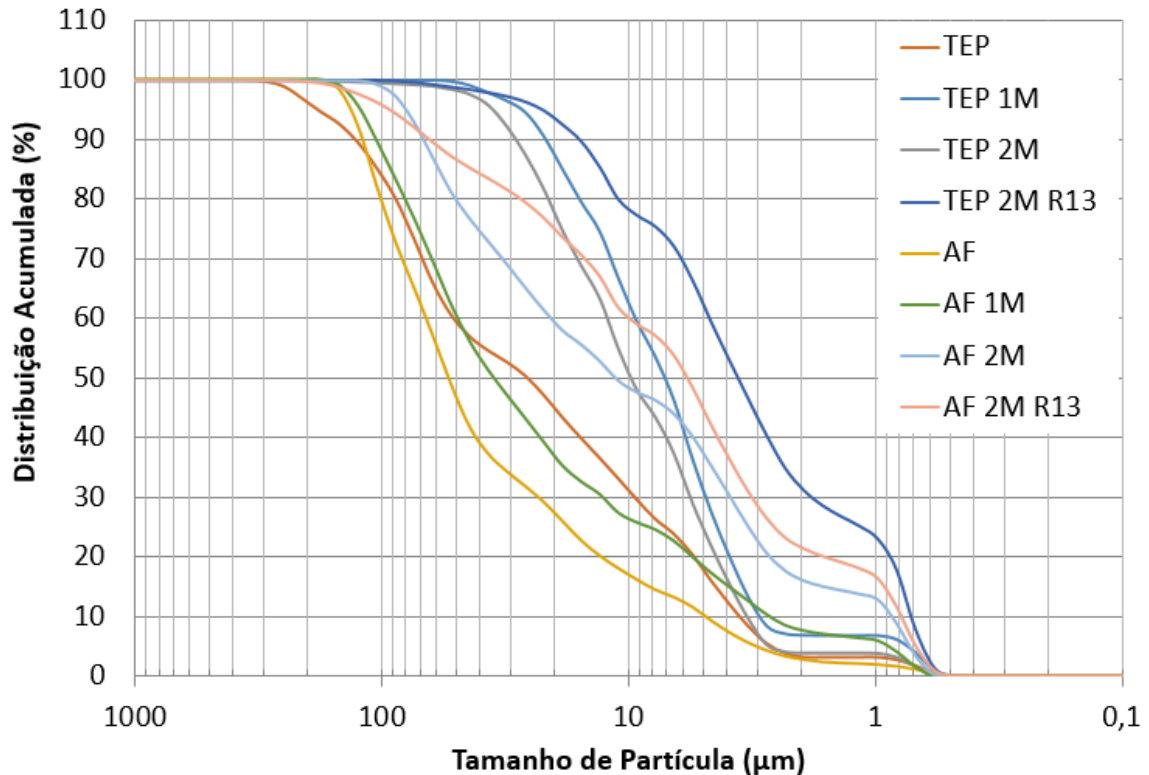
Neste trabalho foi avaliada a influência de algumas variáveis do processo sol-gel sobre as características do pó de vidro bioativo obtido, como apresentado na Tabela 4. Este estudo envolveu a variação Razão (R) Água/TEOS, a mudança do precursor de fósforo (TEP ou AF), o uso ou não de um agente de gelificação, além da variação da concentração desse agente de gelificação quando ele foi empregado para diminuir o tempo de formação do gel.

A variação dessas condições de síntese teve como meta a obtenção do BG58S com composição química mais próxima possível da composição nominal, tamanho de partícula menor que o das partículas do CH e baixa cristalinidade.

De acordo com BBBB (BBB,) o aumento da razão de Razão (R) Água/TEOS é um fator determinante do tamanho das partículas do BG58S, porém, razões maiores que 13 podem levar à diminuição da velocidade da reação de forma extrema. A ideia de se empregar o ácido fosfórico como agente precursor foi uma tentativa de minimizar o custo na obtenção do BG58S, já que o TEP é um reagente de elevado valor comercial. O uso de um acelerador de geleificação é bastante interessante porque diminui o tempo de formação do gel drasticamente, de horas para apenas poucos minutos.

Os resultados quanto a distribuição de tamanho de partículas dos pós obtidos, são apresentados na Figura 12.

Figura 12– Análise da distribuição de tamanho de partículas para os pós de vidro bioativo 58S produzidos de acordo com as condições da Tabela 4.

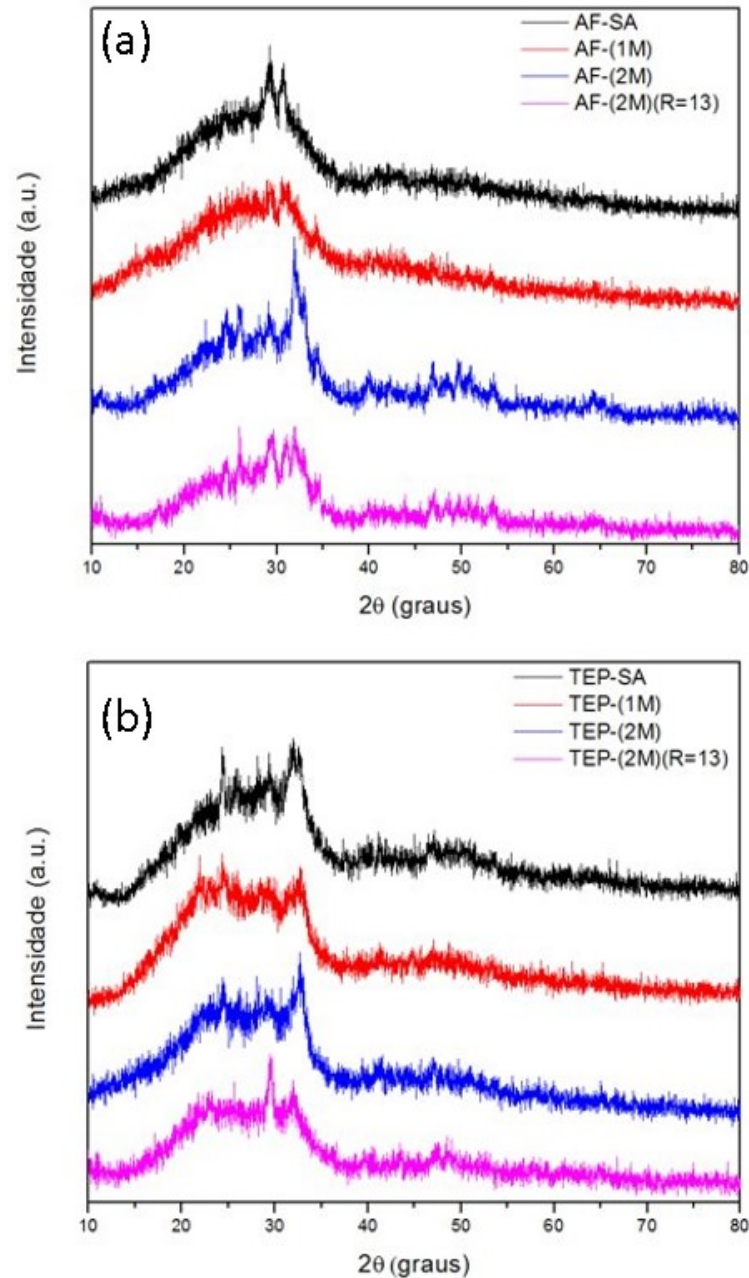


Fonte: o autor

Para que haja um bom empacotamento entre as partículas do vidro bioativo e as partículas do cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH), as partículas do vidro bioativo (BG) devem ser menores que as partículas do CH, as quais possuem diâmetro médio igual a 8 μm (SALOMÃO *et al.*, 2010). Analisando-se a Figura 11, podemos perceber que o vidro bioativo obtido com TEP 2M R13 apresenta mais de 50% das partículas com tamanho inferior a 10 μm , obtendo partículas com diâmetro médio $D_{50} \approx 4 \mu\text{m}$ o que deve favorecer o empacotamento entre as partículas resultando em maior resistência mecânica da blenda CH-BG.

Os pós de vidro bioativo (BG) sintetizados de acordo com as condições apresentadas na Tabela 5 também foram submetidos a análise por Difração de raios X e os resultados são apresentados na Figura 13.

Figura 13 – Difratogramas de raios X dos pós de vidro bioativo 58S sintetizados empregando (a) ácido fosfórico (AF) ou (b) trietilfosfato (TEP) como precursor de fósforo (P).



Fonte: o Autor

Os resultados apresentados na Figura 13 indicam que os pós apresentam baixo grau de cristalinidade. De acordo com a literatura, quanto mais amorfo for o vidro bioativo maior será a sua bioatividade (HENCH; WILSON, 1993).

Os pós de vidro bioativo (BG) sintetizados também foram avaliados quanto à composição química por meio da técnica de espectrometria de raios X por dispersão de energia (EDS), como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição química (análise EDS) dos vidros bioativos 58S sintetizados variando algumas condições do processo sol-gel.

Composição nominal	58%SiO₂	33%CaO	9%P₂O₅
TEP-SA (R=7,85)	49,19-50,17	43,40-43,44	6,90-6,92
TEP-1M (R=7,85)	63,95-64,29	30,80-31,20	4,83-4,91
TEP-2M (R=7,85)	67,15-67,79	26,04-27,22	5,84-5,97
TEP-2M (R=13)	57,28-57,96	32,49-33,59	9,52-9,56
AF-AS (R=7,85)	56,20-56,94	34,51-34,81	8,59-8,93
AF-1M (R=7,85)	56,51-59,07	33,38-35,14	7,66-8,24
AF-2M (R=7,85)	55,20-56,94	33,51-34,81	7,59-8,93
AF-2M (R=13)	53,20-56,94	31,51-34,81	6,59-8,93

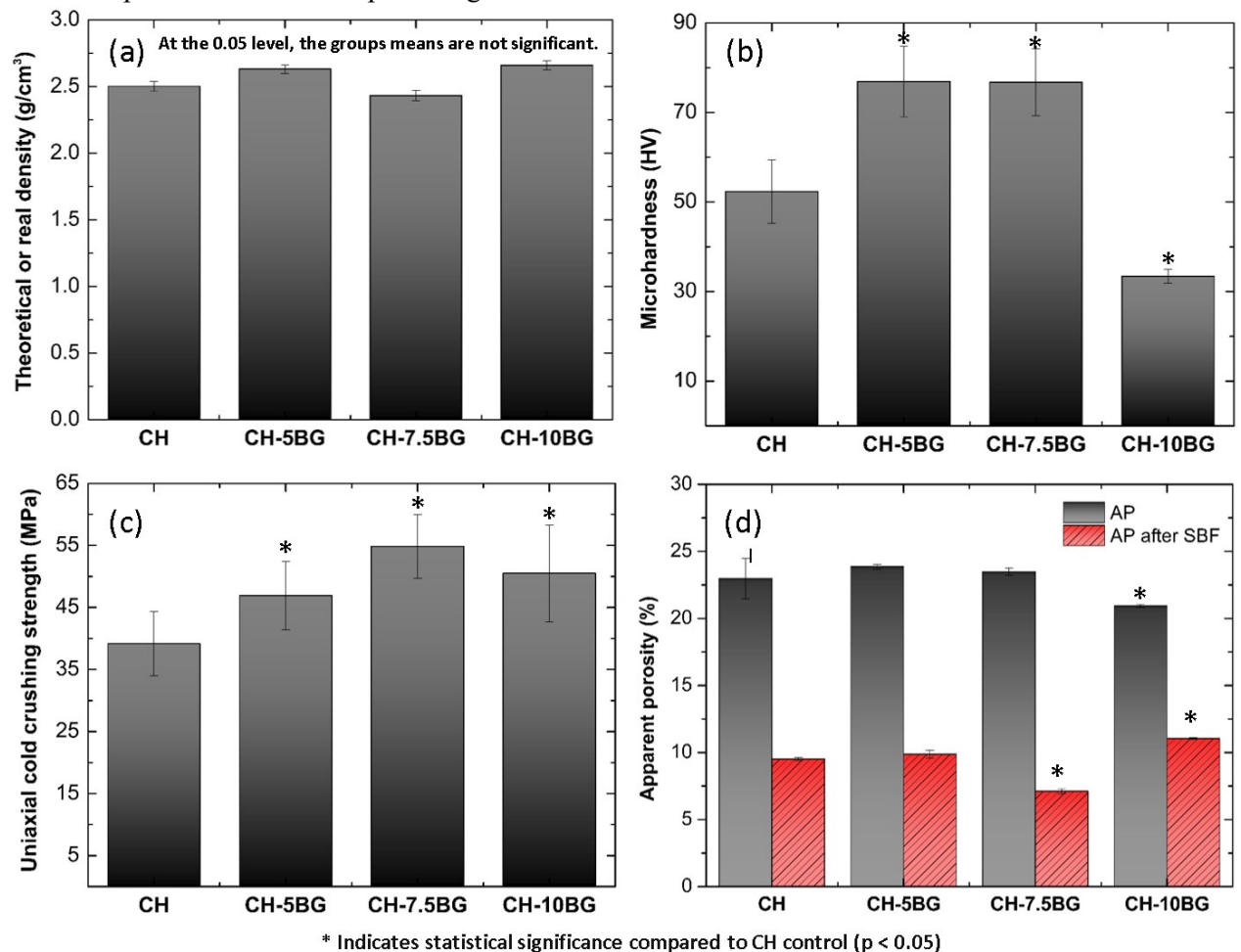
Analisando-se os resultados da Tabela 7, pode-se perceber que os valores para a composição química do vidro bioativo 58S obtido empregando-se TEP e hidróxido de amônia 2 M, com razão de água/TEOS igual a 13, foi o que mais se aproximou dos valores da composição nominal.

Considerando que essa condição de síntese (TEP-2M, R13) apresentou composição química mais próxima à composição nominal e distribuição de tamanho de partículas mais adequada e baixa cristalinidade, este foi o pó de vidro bioativo escolhido para a produção das blendas com cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo ou não estrôncio. A partir de agora, essa condição de síntese passa a ser denominada apenas como BG58S.

5.2 Blendas de CH e BG58S sem óxido de estrôncio (SrO)

Após a seleção do vidro bioativo com as melhores condições de síntese, foi avaliada a influência da adição de vidro bioativo (BG58S) em algumas propriedades do cimento de aluminato de cálcio. Os resultados da caracterização da densidade teórica ou real, propriedades mecânicas e porosidade aparente foram registrados para misturas de cimento de aluminato de cálcio contendo vidro bioativo (5, 7,5 e 10% em peso) e são apresentados na Figura 14. É possível notar que a adição do pó de BG-58S ao cimento homogêneo (CH) influencia significativamente suas propriedades mecânicas.

Figura 14- (a) Densidade teórica ou real; (b) microdureza; (c) resistência à compressão uniaxial depois do tratamento com SBF e (d) porosidade aparente antes e depois do tratamento com SBF para as blendas formadas pelo CH e diferentes porcentagens de BG.



Fonte: O autor

Os resultados apresentados na Figura 14a mostram que a adição de BG ao CH não apresenta diferenças significativas em comparação com a densidade teórica de CH puro, independentemente do conteúdo de BG. As blendas apresentaram valores médios superiores em relação ao tecido ósseo esponjoso (1,25 g/cm³) e tecido ósseo cortical (1,92 g/cm³) (NAKAO *et al.*, 2019).

Analisando os resultados encontrados para microdureza, Figura 14b, pode-se observar que o CH tem sua microdureza melhorada ao se adicionar 7,5% de BG (com significância estatística), indicando que houve uma boa adesão de BG na matriz de cimento. A adição de níveis mais elevados de BG levou à uma redução na microdureza. A composição com 10% de BG tornou-se mais viscosa e mais BG foi notado na superfície das amostras, portanto o teste de microdureza que avalia a resistência a uma deformação plástica localizada pode ter sido mais influenciado pela fase de vidro adicionada, o qual apresenta menor resistência à compressão

em comparação com CH. Nesse caso, o valor obtido foi inferior ao verificado para os tecidos cortical (44,60 MPa) e trabecular (44,66 MPa) (BALA *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos para a resistência à compressão uniaxial após o tratamento com SBF, Figura 14c, mostraram que o comportamento do CH (D50 ~ 8 μ m) melhorou significativamente com a adição de BG (D50 ~ 4 μ m). A presença de duas ou mais matérias-primas em uma mistura à base de cimento afeta as propriedades reológicas e o empacotamento de partículas do sistema. Pós finos tendem a preencher os vazios entre as partículas maiores da mistura, diminuindo o nível de porosidade das amostras preparadas, dependendo das características e do teor dos aditivos incorporados no cimento de aluminato de cálcio. Assim, a blenda CH-10% de BG apresentou diminuição na porosidade aparente antes do tratamento com SBF (Figura 14d). As blendas 7,5% de BG (55 MPa) e 10% de BG (50 MPa) tiveram compressão uniaxial próxima ao menor valor registrado para o osso cortical humano com compressão uniaxial na faixa de 52-196 MPa (HAVALDAR *et al.*; CESAR *et al.*, 2017).

É importante que o biomaterial utilizado para o reparo ósseo apresente resistência mecânica próxima ao osso para suportar os mesmos níveis de estresse. A concentração de tensões acima do limite do material pode causar defeitos como microfraturas e, conseqüentemente, favorecer a proliferação bacteriana, infiltração e deslocamento do material. Os aumentos observados na resistência dessas misturas também podem ser correlacionados à queda significativa na porosidade aparente observada após o tratamento com SBF, conforme mostrado na Figura 14d.

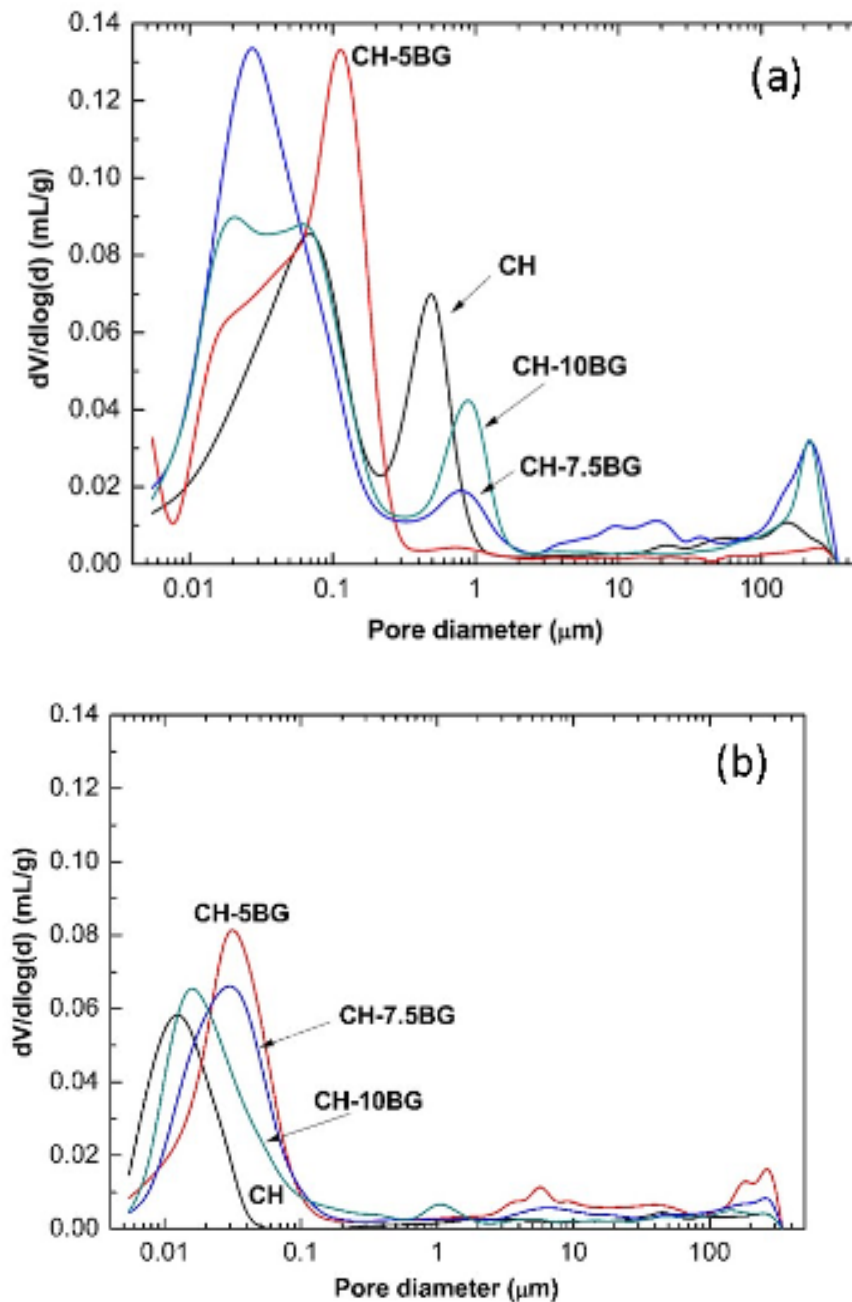
De acordo com estudos anteriores (QUERIDO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2018) a queda significativa da porosidade aparente observada após o tratamento com SBF pode ser explicada pela presença de precipitados na superfície dos materiais. Assim, o mesmo efeito deve ter ocorrido para o CH puro e as misturas com BG no presente trabalho. A interação desses biomateriais com os íons disponíveis na solução de SBF promove a formação de precipitados, que recobrem a superfície dos materiais e preenchem os poros, reduzindo sua porosidade aparente. Este efeito foi mais significativo para a mistura 7,5% de BG em comparação com 10% de BG.

Este comportamento pode estar associado ao fato da blenda CH-10% de BG apresentar menor porosidade antes do SBF e conseqüentemente menos poros a serem preenchidos pelos precipitados.

Outra consequência observada por esses autores é que o tamanho geral dos poros dos biomateriais é menor após o tratamento com SBF quando comparados aos materiais colocados

apenas em contato com a água. Os resultados da distribuição de tamanho dos poros ($dV/d\log d$) sem ou com o tratamento com SBF para misturas de cimento de aluminato de cálcio contendo vidro bioativo (5, 7,5 e 10% em peso) são mostrados na Figura 15. Todas as amostras mostraram porosidade aparente reduzida e diâmetro de poro menor após o tratamento com SBF indicando a formação de precipitados que fecham os poros. Após o tratamento com SBF, poros maiores que $0,2 \mu\text{m}$ não são mais observados.

Figura 15- Distribuição de tamanho de poros (a) sem e (b) com tratamento com SBF para blendas formadas com cimento de aluminato de cálcio (CH) com diferentes quantidades de vidro bioativo (BG).



Fonte: O autor

1974 e 75 % de teor sólidos são apresentados nas Figura 16 e17, respectivamente. Observa-se que o aumento da viscosidade está relacionado à diminuição da injetabilidade, conforme há aumento no teor sólido das suspensões.

A trabalhabilidade das suspensões de CACH-BG também é apresentada na Figura 18. De modo geral, pode-se dizer que a adição de BG58S ao CH permitiu um leve aumento nos valores de trabalhabilidade quando se comparado ao CH puro.

Figura 16- Viscosidade das suspensões de CH com a adição de 5%, 7,5% e 10%-p de BG58S contendo 73, 74 e 75 %-p de teor sólido, avaliados a uma taxa de cisalhamento de $50s^{-1}$.

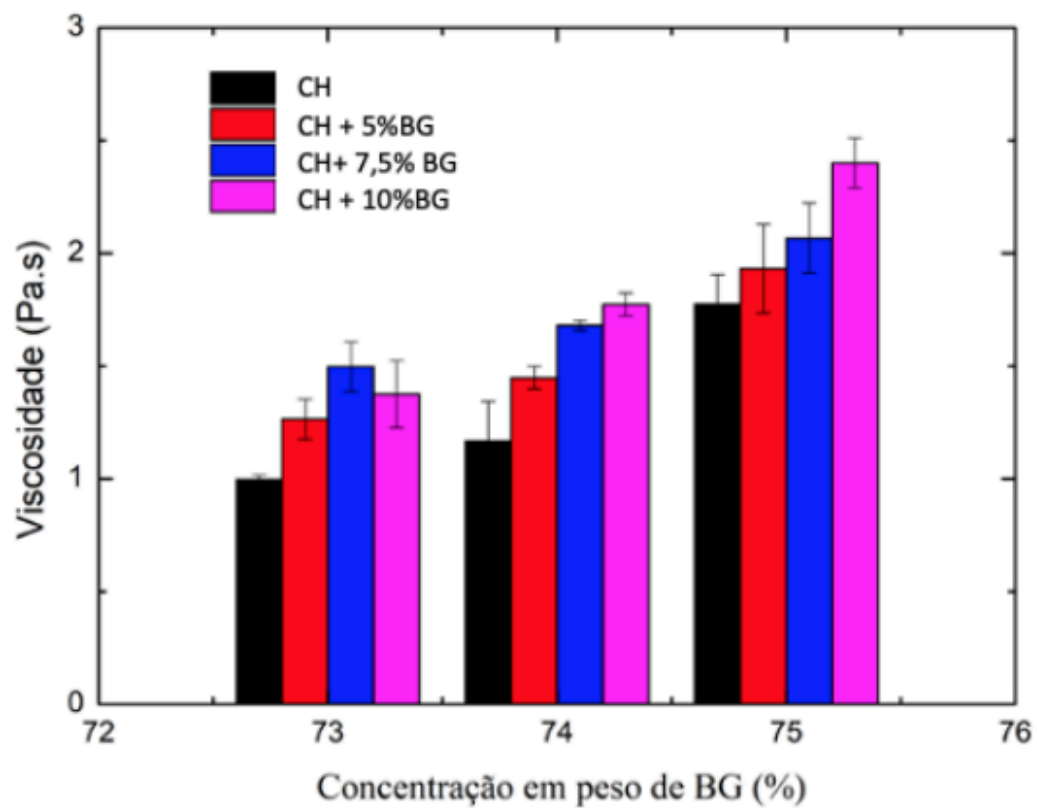


Figura 17- Injetabilidade das suspensões de CH com a adição de 5%, 7,5% e 10% de BG58S a 73, 74 e 75 % p de teor sólido.

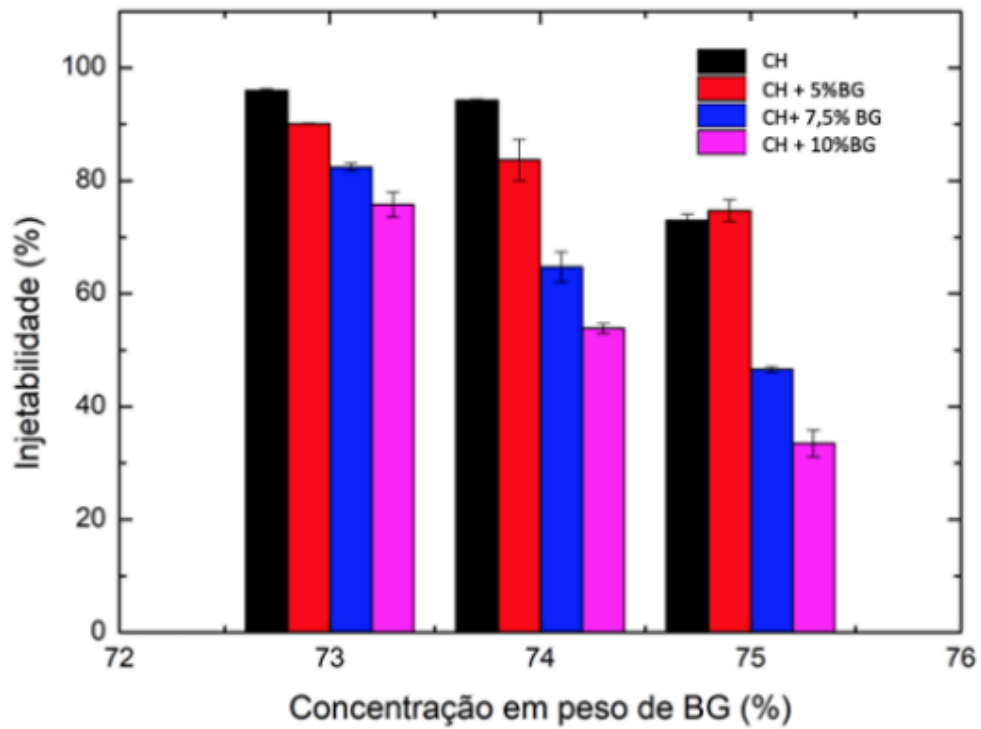
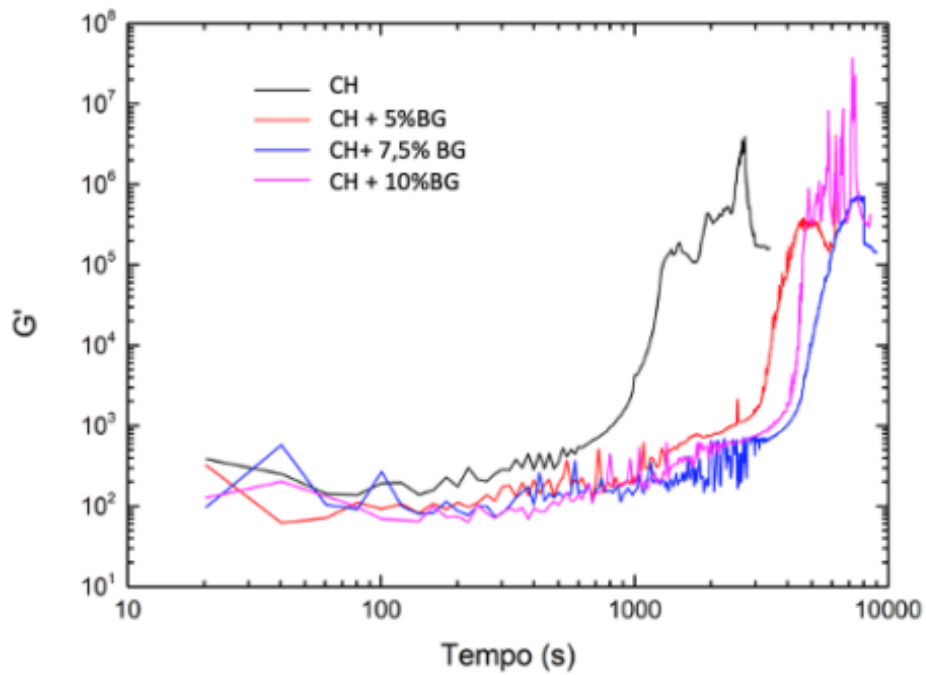


Figura 18- (a) Trabalhabilidade das suspensões de CH-BG com 74 % de teor sólido avaliado por teste oscilatório (G' x tempo).

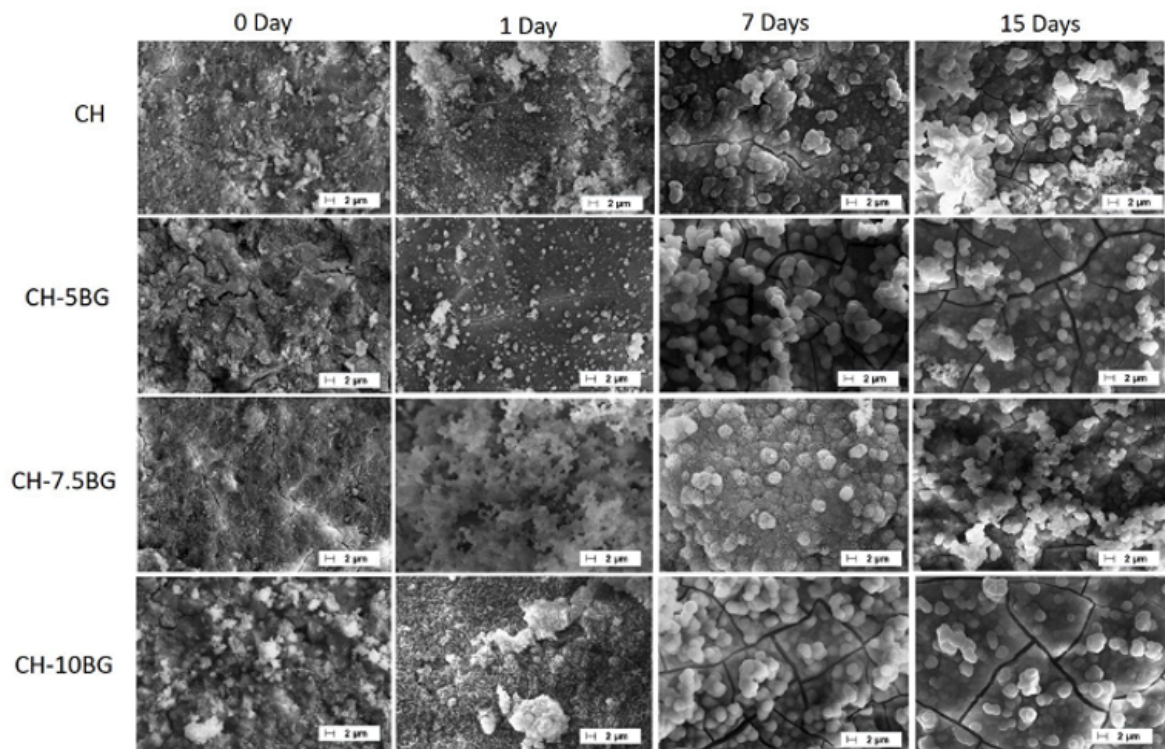


5.3 Blendas de CH e BG58S com 1%-p de óxido de estrôncio (SrO)

Esta etapa do presente estudo teve como foco os testes de bioatividade e cultura de células nas blendas CH-BG 1%-p de óxido de estrôncio. As blendas formadas apenas por CH e BG58S também foram ensaiadas para que pudesse ser realizado um estudo comparativo e, assim verificar a influência ou não do óxido de estrôncio (SrO) na intensificação da bioatividade. A presença de precipitados na superfície dos materiais devido à reação entre suas superfícies com os íons disponíveis na solução de SBF indica sua bioatividade. Bioatividade é definida como a capacidade do material de gerar uma camada de hidroxiapatita carbonatada em sua superfície, a fim de induzir fortes ligações interfaciais com tecidos vivos (SEABRA, 2013).

A formação de precipitados na superfície da amostra pode ser observada nas micrografias (MEV) conforme apresentado na Figura 19 para blendas à base de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG), sem ou com tratamento com SBF. O tratamento com SBF promoveu alterações na superfície das amostras em função do tempo quando comparadas às amostras antes do tratamento.

Figura 19 - Micrografias eletrônicas de varredura para as blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG), sem ou com tratamento em SBF por 1, 7 e 15 dias. As fraturas nas camadas recém-formadas foram causadas pelo processo de secagem das amostras.



Fonte: o autor

A formação de uma camada superficial de precipitados após a imersão em SBF ocorreu principalmente para composições com 7,5% em peso de BG a partir de 1 dia em SBF. Isso é indicativo de que a adição de BG a CH melhorou sua bioatividade. O vidro bioativo (BG58S) possui excelente bioatividade promovendo a ligação química aos tecidos ósseos por meio de uma camada de apatita em sua superfície quando exposta a fluidos fisiológicos (TENGJIAO et al., 2017; KAUR et al., 2016; WU et al., 2010).

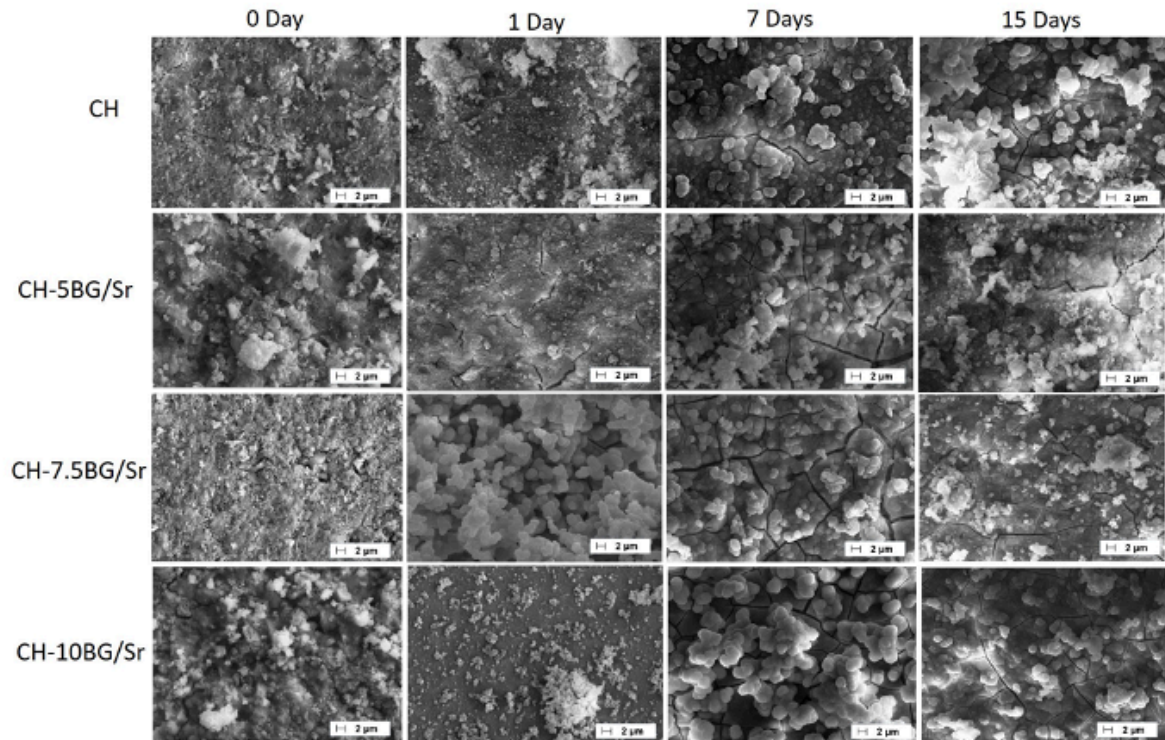
O vidro bioativo (BG58S) sofre uma sequência de reações químicas quando imerso em SBF, o que pode explicar seu mecanismo de bioatividade. No início, ocorre a rápida troca de íons H^+ da solução fisiológica por cátions modificadores presentes em sua superfície e, dessa forma, os grupos sílica hidrolisam levando à formação de ligações silanol (Si-OH) em sua superfície. Em seguida, mais ligações silanol são formadas devido à hidrólise das ligações Si-O-Si devido ao aumento do pH e ocorre a condensação e repolimerização dos silanóis superficiais para formar uma camada superficial rica em SiO_2 . Essa camada reage com os íons

Ca^{2+} e PO_4^{3-} que migram do material e do meio para a superfície, induzindo a formação de uma camada amorfa de fosfato de cálcio. Por fim, ocorre a incorporação dos íons hidróxido e carbonato do meio e essa camada amorfa cristaliza progressivamente em uma apatita carbonatada reativa biológica (BUI et al., 2013; BALAMURUGAN et al., 2006; ISLAN et al., 2017). Essa camada de hidroxiapatita carbonatada é química e estruturalmente equivalente à fase mineral óssea, favorecendo a ligação química entre o biomaterial e o osso (SEABRA, 2013).

De acordo com a literatura, vidro bioativo (BG58S) também foi adicionado ao cimento de aluminato de cálcio (5, 7,5 ou 10% em peso) sendo verificado aumento na quantidade de apatita formada após imersão em SBF com o aumento da quantidade de BG, principalmente devido à alta solubilidade da fase amorfa (GARCIA-ÁLVAREZ *et al.*, 2019). Aglomerados de um composto rico em Ca e P com morfologia esférica foram formados após 21 dias. O composto formado foi identificado por DRX como hidroxiapatita (HA) nas amostras contendo 7,5 e 10% em peso de BG. A intensidade dos picos correspondentes ao HA aumenta à medida que o conteúdo de BG aumenta, indicando que o material se torna mais bioativo (GARCIA-ÁLVAREZ *et al.*, 2019).

As micrografias de MEV obtidas para blendas à base de cimento de aluminato de cálcio homogêneo contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG58S) e 1% em peso de óxido estrôncio (SrO), sem ou com tratamento com SBF são apresentadas na Figura 20. Observa-se que a adição de SrO na composição não influenciou significativamente na precipitação de fases promovida pela adição de BG, mantendo a formação de uma camada superficial de precipitados principalmente para blendas com 7,5 e 10% em peso de BG e 1% em peso de estrôncio (Sr) a partir de 1 dia em SBF.

Figura 20 - Micrografias SEM para as blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes quantidades de vidro bioativo (BG58S) e 1%p de óxido de estrôncio (SrO) sem ou com tratamento em SBF por 1, 7 e 15 dias. As fraturas nas camadas recém-formadas foram causadas pelo processo de secagem das amostras.



Fonte: O autor

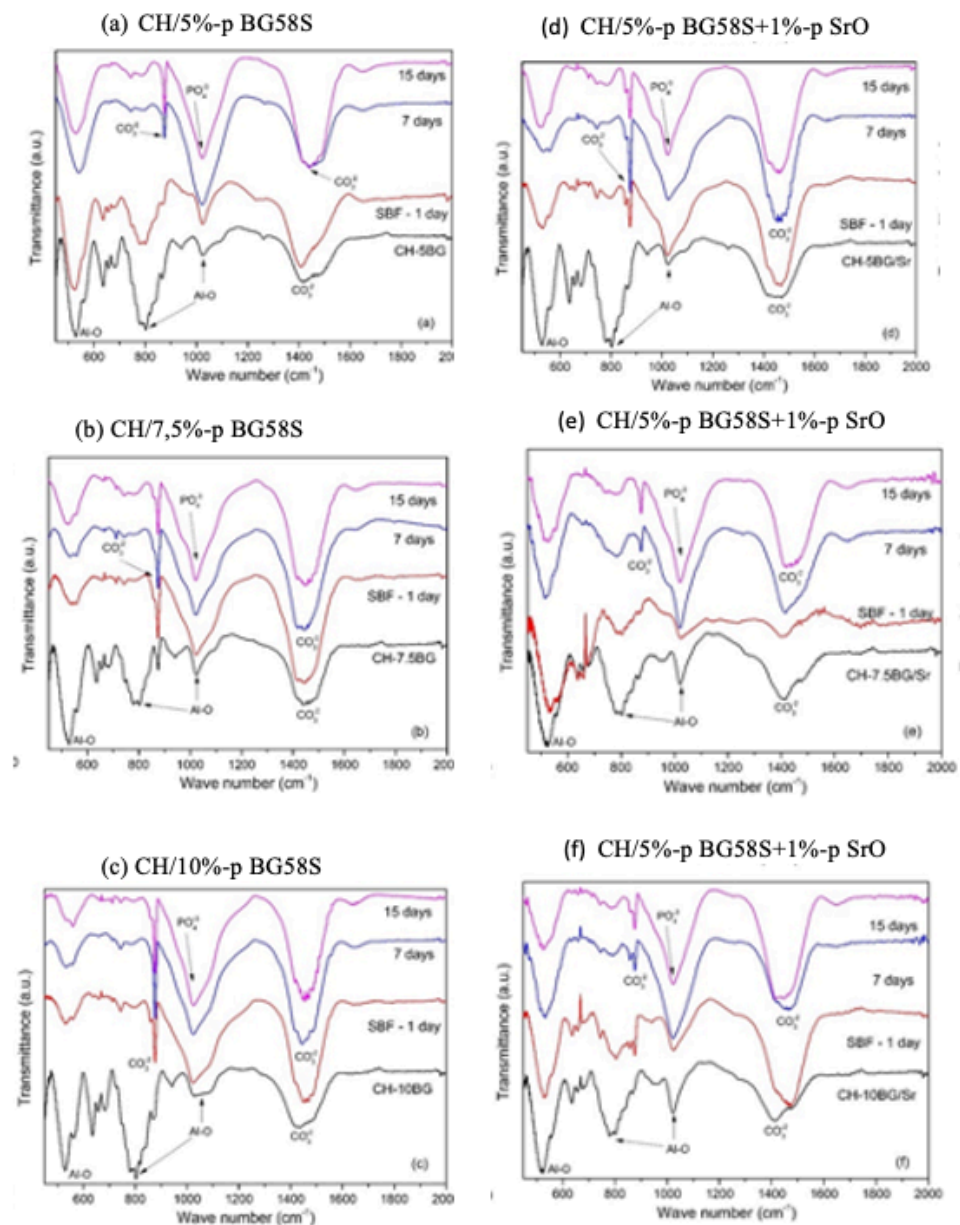
A Tabela 8 mostra as análises de EDS das superfícies da mistura antes e depois da interação com SBF por 1, 7 e 15 dias. A formação do composto rico em Ca e P na superfície, que pode corresponder à apatita, pode ser indicada principalmente pelo aumento de P no espectro de EDS após SBF. Por outro lado, observa-se diminuição no teor de alumínio, que é um dos principais elementos químicos encontrados no CH (substrato).

Tabela 8 - Análises EDS para as superfícies das blendas antes e depois do tratamento com SBF por 1, 7 e 15 dias.

Composição química (%-p)	O	Al	Si	P	Ca
CH	57.3±0.5	20.2±0.8	-	-	11.3±0.7
CH-1 dia	58.6±0.4	16.0±1.4	-	1.2±0.2	12.8±1.3
CH-7 dias	62.1±2.5	21.2±2.7	-	0.8±0.1	8.3±1.8
CH-15 dias	57.6±1.1	3.3±0.6	-	9.3±0.2	21.0±0.9
CH-5BG	51.3±0.7	18.6±0.4	3.2±0.3	0.3±0.1	12.3±0.2
CH-5BG-1 dia	61.9±0.5	12.0±0.4	2.2±0.2	2.9±0.4	21.1±0.7
CH-5BG-7 dias	60.0±0.3	1.4±0.4	0.4±0.2	13.5±0.2	24.8±0.2
CH-5BG-15 dias	62.2±0.8	3.4±1.5	1.7±0.2	11.3±0.2	21.4±0.8
CH-7.5BG	62.9±0.3	24.3±0.2	0.6±0.1	-	12.5±0.2
CH-7.5BG-1 dia	59.3±2.2	3.2±1.8	0.6±0.1	12.7±1.6	24.2±2.4
CH-7.5BG-7 dias	62.3±0.7	11.2±0.9	0.6±0.2	7.6±0.5	18.3±0.9
CH-7.5BG-15 dias	61.4±1.1	6.3±0.9	0.4±0.1	10.8±0.4	21.1±0.7
CH-10BG	56.1±0.8	26.1±0.6	0.8±0.1	0.5±0.1	16.5±0.5
CH-10BG-1 dia	68.8±1.2	10.0±0.3	3.4±0.2	4.1±0.3	13.8±0.9
CH-10BG-7 dias	63.9±0.5	0.3±0.1	0.3±0.1	13.5±0.2	22.2±0.3
CH-10BG-15 dias	58.1±1.2	2.6±0.3	1.0±0.2	12.6±0.4	25.7±0.7
CH-5BG/Sr	59.6±1.4	22.8±1.6	3.5±0.6	0.3±0.2	13.9±0.8
CH-5BG/Sr-1 dia	60.3±0.5	15.6±1.4	7.5±1.3	1.0±0.2	14.9±0.4
CH-5BG/Sr-7 dias	66.8±1.7	10.4±1.1	7.0±1.7	3.6±0.5	11.0±1.0
CH-5BG/Sr-15 dias	58.8±0.4	4.6±0.8	5.3±0.6	10.2±0.7	19.7±0.6

Os espectros de FTIR das blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG58S) e 1% em peso de óxido de estrôncio (SrO) antes e após a imersão em solução de SBF em diferentes períodos de tempo são apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Espectros FTIR para as blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) (a) CH-5%BG58S; (b) CH-7,5%BG58S (c) CH-10%BG58S e (d) CH-5%BG58S 1 %-p SrO (e) CH-7,5%BG58S 1 %-p de SrO, e (f) CH-10%BG58S e 1 %-p SrO sem e com tratamento em SBF por 1, 7 and 15 dias.



As bandas em 1029 cm⁻¹, 780 cm⁻¹ e 533 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações de alongamento e balanço das ligações Al – O do cimento hidratado (MAITRA et al., 2005). A

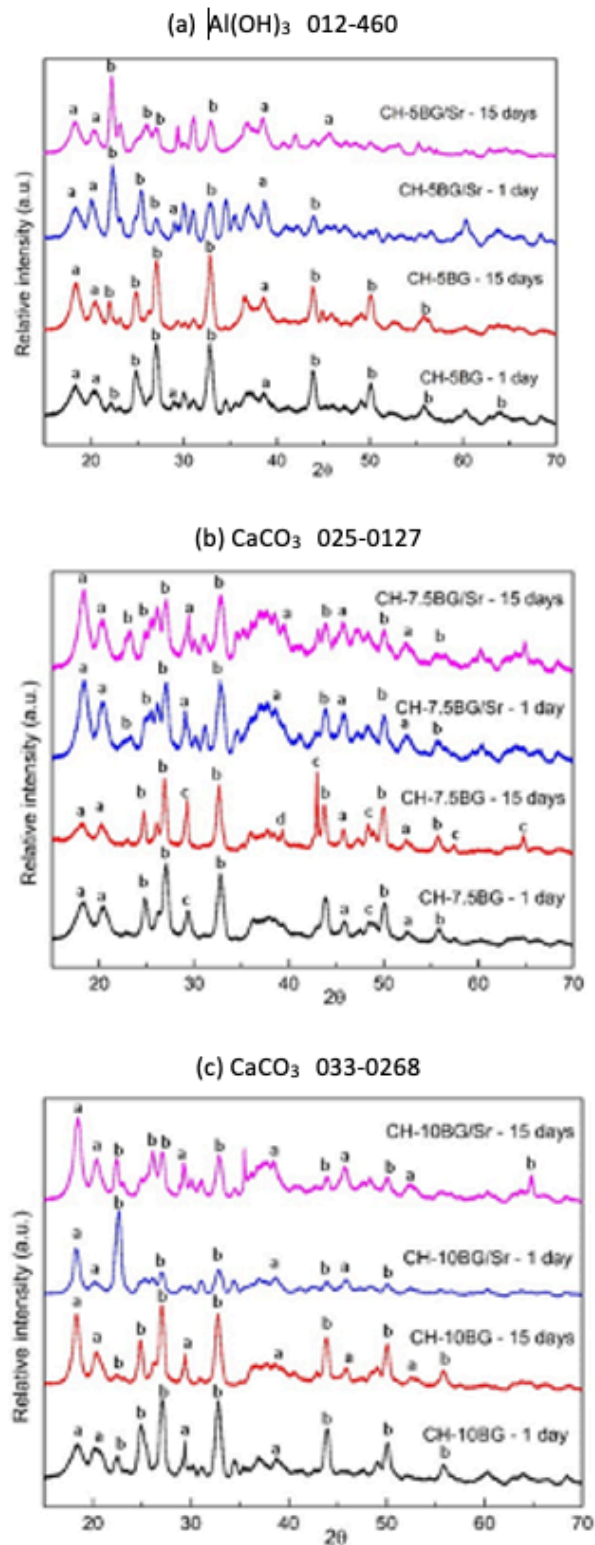
banda em 1421–1433 cm^{-1} corresponde ao alongamento da ligação C-O do CO_3^{2-} , resultante da carbonatação do aluminato hidratado. A exposição das pastas de cimento ao ar resulta em uma carbonatação muito rápida.

Após o tratamento com SBF, a intensidade do pico de PO_4^{3-} em 1030 cm^{-1} aumentou indicando a formação da fase apatita (REZAEI *et al.*, 2014) e os picos característicos de CO_3^{2-} nos números de onda de 872 e 1440 cm^{-1} também foram detectados devido à reatividade da superfície das amostras com o CO_2 da atmosfera (WU *et al.*, 2010; QIU *et al.*, 2000; MAÇON *et al.*, 2017; LUZ; MANO, 2011). Por fim, a dissolução e formação do processo de apatita pode ser verificada pelo aumento da intensidade do pico em 1030 cm^{-1} correspondente a PO_4^{3-} .

Quando comparado com as misturas sem estrôncio, a dissolução na presença de estrôncio é reduzida. A intensidade da banda correspondente ao grupo PO_4^{3-} no número de onda 1030 cm^{-1} que indica a formação da fase apatita é menor para misturas com Sr principalmente para os teores de 7,5 e 10% em peso de BG- 1% em peso de Sr após 1 dia em SBF em comparação com as amostras sem Sr. Isso mostrou que a presença de estrôncio não inibiu a formação da camada de fosfato de cálcio, mas retardou sua taxa de precipitação (EREIBA *et al.*, 2014).

A Figura 22 apresenta os padrões de XRD de blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) e 1% em peso de estrôncio (Sr) antes e depois da imersão em solução de SBF por 1 e 15 dias.

Figura 22 - Difratomogramas XRD para as blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes porcentagens de vidro bioativo (BG) sem e com 1 %-p de estrôncio (Sr) após tratamento em SBF por 1 e 15 dias.

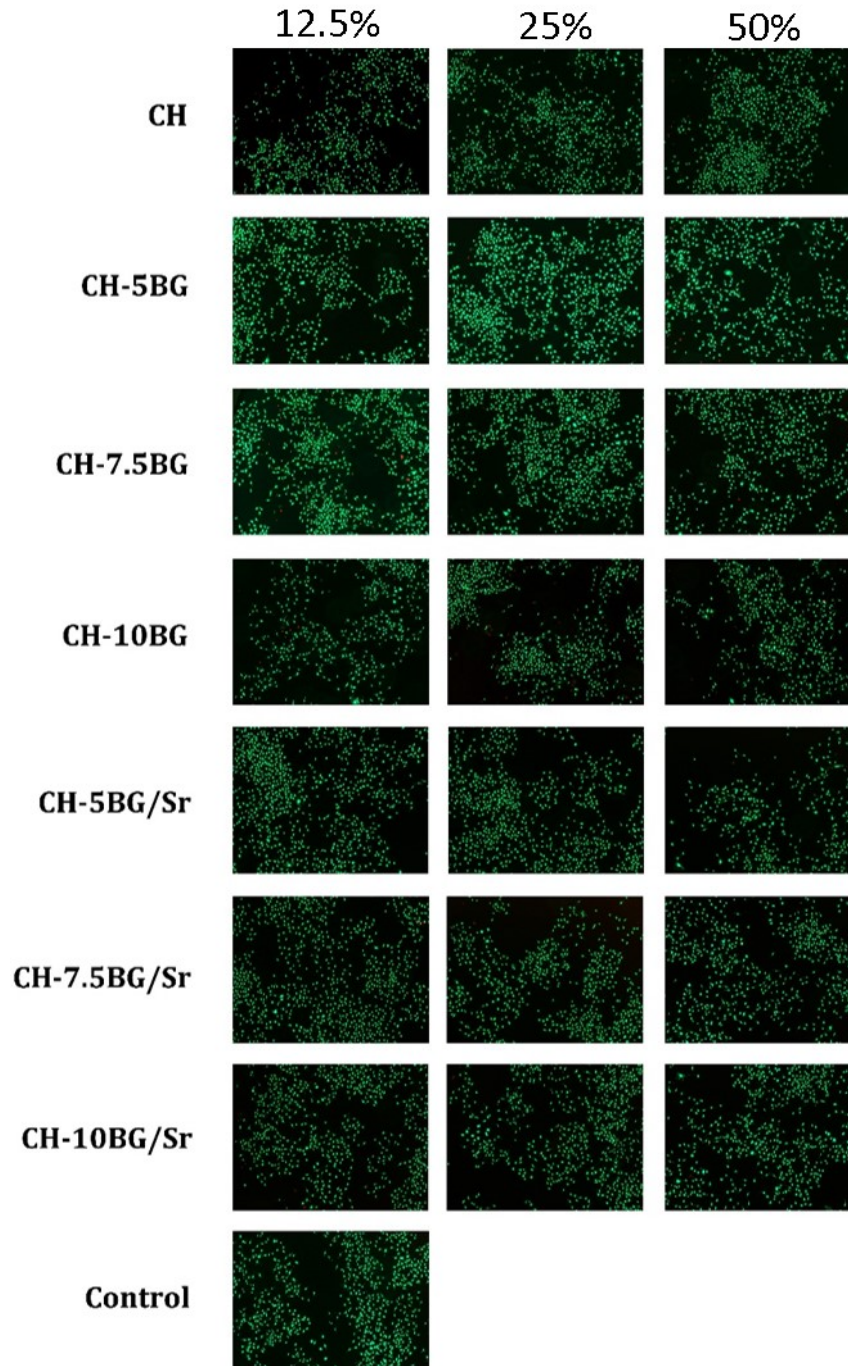


Fonte: o autor.

Após imersão em SBF, as blendas apresentaram a presença de gibbsita ($\text{Al}(\text{OH})_3$), e principalmente evidências da formação de carbonato de cálcio cristalino. Nos últimos anos, a síntese de CaCO_3 foi estudada em detalhes devido às suas aplicações ortopédicas, medicamentosas e biomédicas. Partículas esféricas de CaCO_3 apresentaram rápida penetração em fibroblastos humanos e não apresentaram citotoxicidade (ORAL; ERCAN, 2018). A identificação da fase de fosfato de cálcio precipitado não pode ser feita com precisão possivelmente por se tratar de uma fase amorfa.

Os resultados da análise qualitativa da viabilidade celular em culturas de células pré-osteoblásticas expostas aos extratos das blendas por 72 horas são apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Viabilidade celular em cultura de células pré-osteoblásticas expostas aos extratos das blendas de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) e estrôncio (Sr) em concentrações de 12.5%, 25% and 50% e na ausência (controle) por 3 dias. As marcações em verde indicam viabilidade celular e as em vermelho, indicam células mortas. Barra de escala=200 μ m.



Fonte: o autor

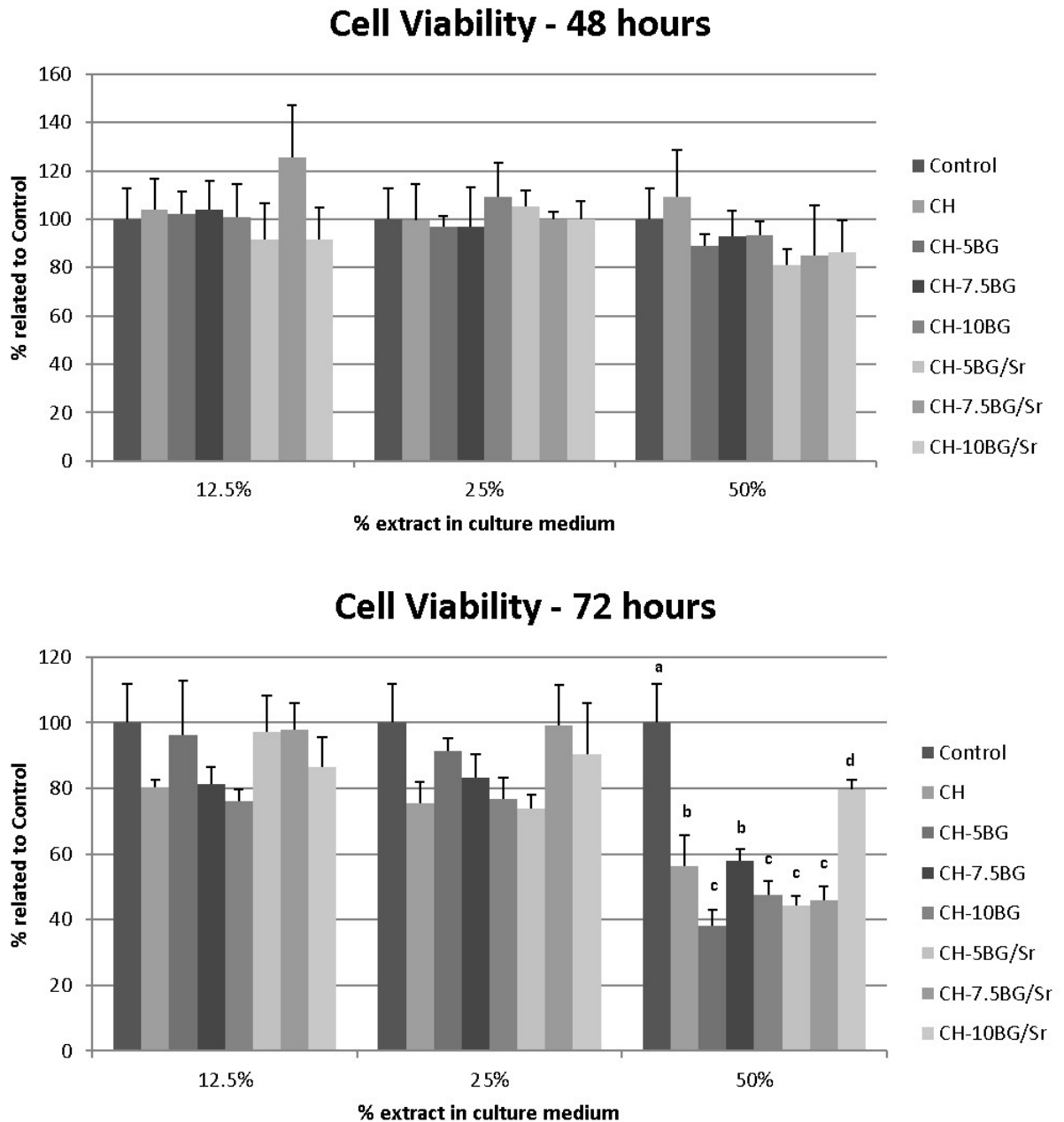
As células viáveis foram marcadas com fluorescência verde, enquanto as células mortas foram marcadas com fluorescência vermelha. A predominância de células viáveis foi detectada em todos os grupos experimentais. Na comparação entre grupos de mesma concentração, em

12,5%, 25% e 50%, notou-se ligeira queda na densidade celular nos grupos CH e CH-10BG, enquanto os demais grupos apresentaram densidades celulares semelhantes ao controle.

A viabilidade/citotoxicidade também foi avaliada quantitativamente por meio da atividade mitocondrial após 48 e 72 horas de exposição aos extratos das blendas, utilizando o ensaio colorimétrico MTT, conforme apresentado na Figura 24. Após 48 horas de exposição, níveis semelhantes de viabilidade celular foram detectados no controle e em todos grupos, independentemente da concentração utilizada (Kruskal Wallis / SNK; $p > 0,05$).

Após 72 horas, o ensaio de MTT não revelou diferenças estatísticas para os valores de viabilidade celular entre os grupos nas concentrações de 12,5% e 25% (Kruskal Wallis / SNK; $p > 0,05$). No entanto, na concentração de 50%, foram detectadas diferenças significativas entre os valores de viabilidade celular obtidos nos grupos: Controle > CH-10BG/Sr > CH-7,5BG = CH > CH-10BG = CH-7,5BG/Sr = CH- 5BG Sr = CH-5BG (Kruskal Wallis / SNK; $p < 0,05$).

Figura 24 - Teste de viabilidade celular (MTT) em culturas de células pré-osteoblásticas expostas aos extratos das composições de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) e estrôncio (Sr) em concentrações de 12,5%, 25% e 50% e na sua ausência (controle) for 48 e 72 horas. As letras diferentes para as amostras (50%, 72 h) indicam diferenças significativas entre os grupos na mesma concentração (Kruskal Wallis/SNK, $p < 0.05$). Para todos os outros resultados não houve diferença estatística.



Fonte: o autor

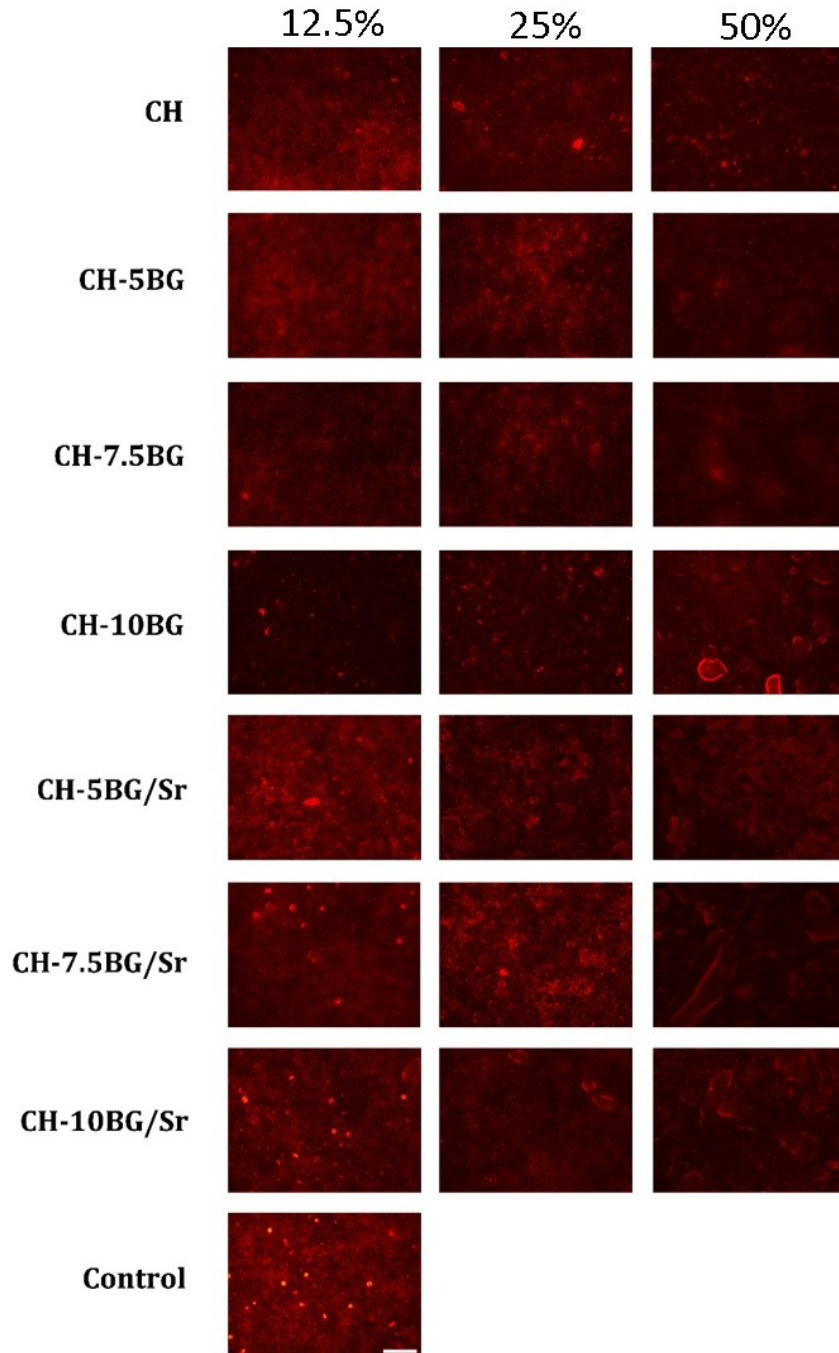
A diminuição da viabilidade celular observada em culturas expostas à diluição de 50% do meio de cultura pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo aumento da concentração de íons cálcio e hidroxilas no meio de cultura, resultando em aumento do pH do microambiente

celular; na verdade, níveis muito elevados de cálcio podem promover a morte celular por apoptose ou necrose (ORRENIUS et al., 2003).

Letras diferentes nas amostras (50%, 72 h) indicam uma diferença significativa entre os grupos na mesma concentração (Kruskal Wallis / SNK, $p < 0,05$). Para todos os outros resultados, não houve diferença estatística.

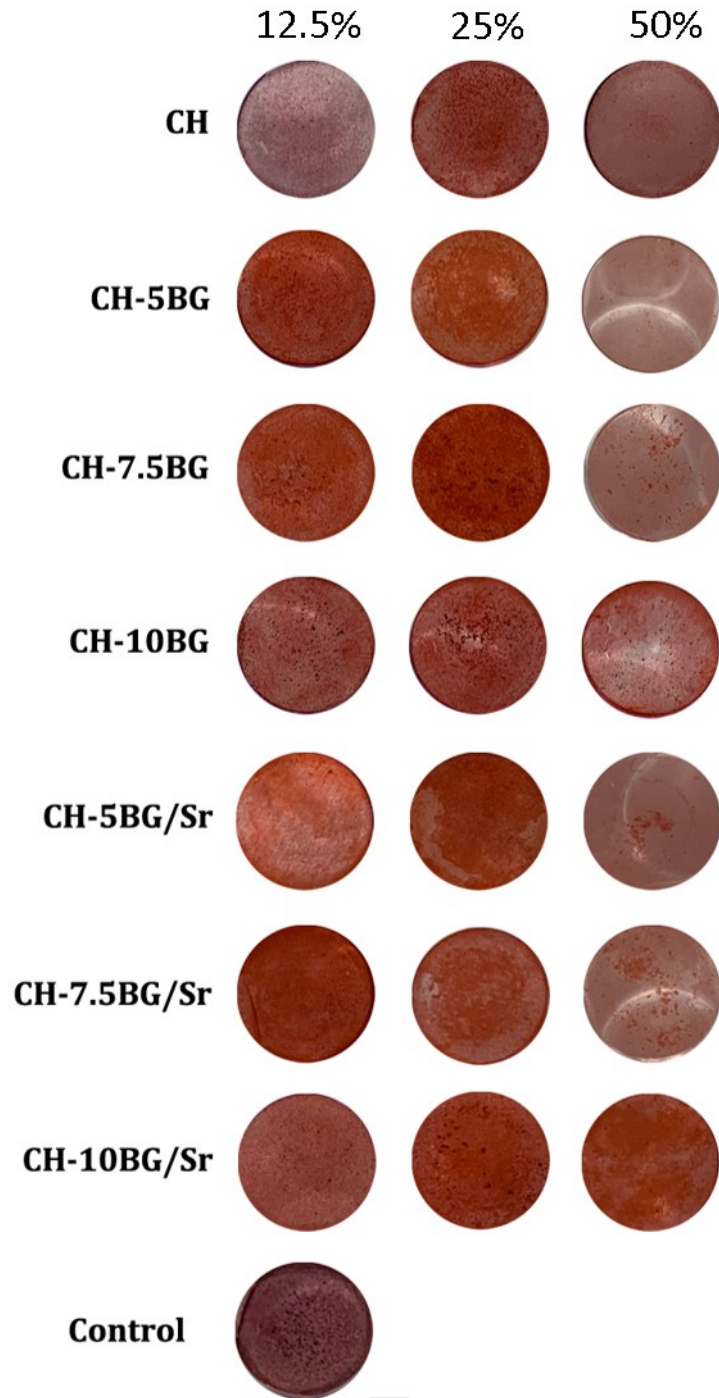
As Figuras 25 e 26 mostram os resultados obtidos para a avaliação qualitativa da atividade de ALP após 7 dias e formação de nódulo mineralizado após 14 dias, respectivamente. A quantificação bioquímica da mineralização no dia 14 é mostrada na Figura 27.

Figura 25 - Atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) em cultura de células pre-osteoblásticas expostas aos extratos das composições de cimento de aluminato de cálcio (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) e estrôncio (Sr) em concentrações de 12,5%, 25% e 50% e na sua ausência (controle) após 7 dias. Barra de escala = 200 μ m.



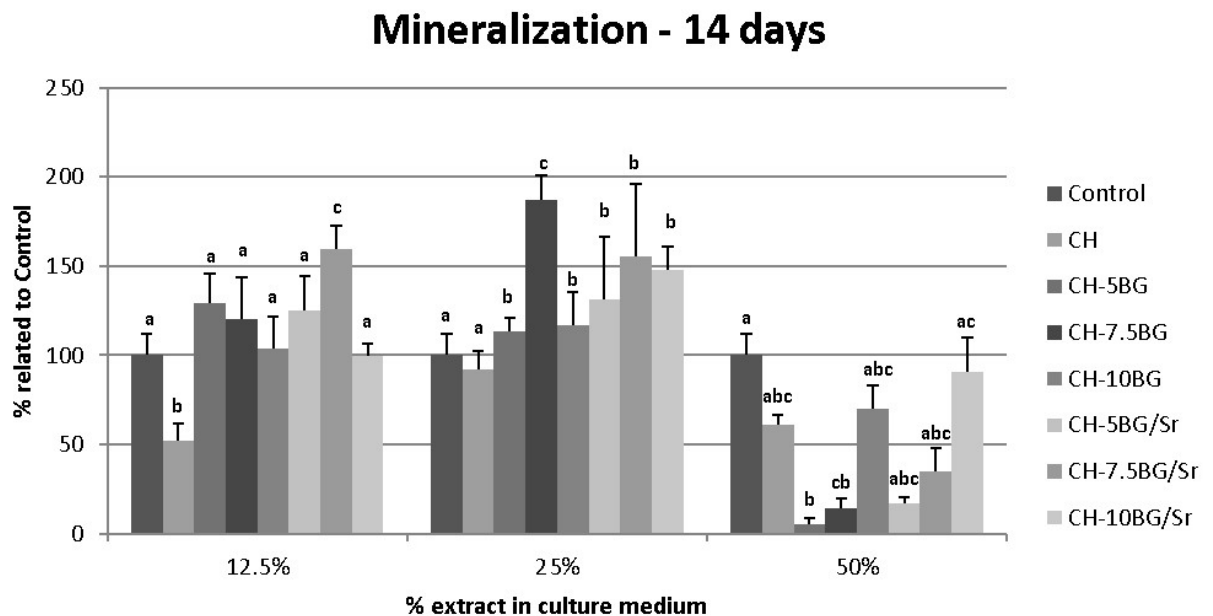
Fonte: o autor

Figura 26- Aspectos macroscópicos da marcação com alizarina em culturas osteoblásticas de MC3T3-E1 expostas aos extratos das composições de cimento de aluminato de cálcio (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) e estrôncio (Sr) em concentrações de 12,5%, 25% and 50% e em sua ausência (controle) após 14 dias. Barra da escala = 200 μ m.



Fonte: o autor

Figura 27 - Quantificação bioquímica da mineralização em culturas de células osteoblásticas MC3T3-E1 expostas aos extratos das composições de cimento de aluminato de cálcio homogêneo (CH) contendo diferentes teores de vidro bioativo (BG) e estrôncio (Sr) em concentrações de 12,5%, 25% and 50% após 14 dias. As letras diferentes entre as amostras indicam uma diferença significativa entre os grupos de mesma concentração (Kruskal Wallis / SNK, $p < 0.05$).



Fonte: o autor

A partir da avaliação qualitativa da atividade da ALP pela marcação *Fast Red*, foram encontradas colônias positivas para a atividade da enzima fosfatase alcalina em todos os grupos experimentais expostos aos extratos de cimento, apresentando aspectos macroscópicos semelhantes aos do controle (Figura 25).

Ao final de 14 dias, a marcação dos depósitos de cálcio por vermelho de alizarina revelou diferenças significativas para o potencial osteogênico dos diferentes cimentos testados (Figura 22). Os aspectos morfológicos revelaram áreas positivas para depósitos de cálcio em todos os grupos de cimento nas concentrações de 12,5% e 25%, principalmente para CH-7.5BG/Sr (12,5%) e CH-7.5BG (25%). Em 50%, houve queda na marcação do vermelho de alizarina em todos os grupos de cimento, exceto pelo CH-10BG/Sr, que manteve aspectos macroscópicos semelhantes aos do controle.

Em uma análise quantitativa do teste de mineralização da matriz extracelular (Figura 23), foi revelado que para a concentração de 12,5%: CH-7.5BG/Sr > CH-5BG = CH-5BG/Sr = CH-7.5BG = CH-10BG = Controle = CH-10BG/Sr > CH (Kruskal Wallis / SNK; $p < 0,05$). A 25%: CH-7,5BG > CH-7,5BG/Sr = CH-10BG/Sr = CH-5BG/Sr = CH-10BG = CH-5BG > Controle = CH (Kruskal Wallis / SNK; $p < 0,05$). A 50%: CH-10BG/Sr = Controle = CH-10BG

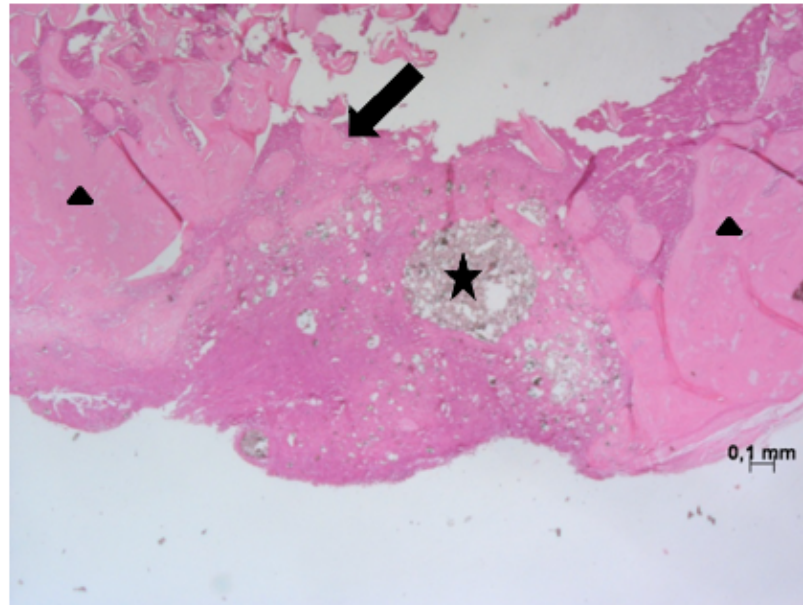
= CH > CH - 7,5BG/Sr > CH -5BG/Sr = CH -7,5BG > CH -5BG (Kruskal Wallis / SNK; $p < 0,05$).

Os achados de diferenciação celular revelaram que todas as blendas permitiram o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, uma vez que as culturas foram positivas para atividade de ALP e depósitos de mineralização da matriz. A partir dos dados de mineralização, observou-se que a inclusão de BG-58S e Sr no CH promoveu o processo de osteogênese, principalmente para os grupos CH -7,5BG, CH -7,5BG/Sr e CH-10BG/Sr, com aumento na formação de matriz mineralizada em relação ao CH.

Sabe-se que quando o BG entra em contato com fluidos fisiológicos, ocorre a dissolução da superfície e íons são liberados no meio. Assim, os efeitos dessas formulações na mineralização da matriz podem estar relacionados tanto ao íon Ca^{2+} quanto ao Sr^{2+} . Pequeno aumento nos níveis fisiológicos de cálcio tem efeitos positivos na diferenciação osteoblástica (CASTRO-RAUCCI et al., 2011; DVORAK; RICCARDI, 2004; NARITA et al., 2010; MATSUMOTO et al., 2013). Em geral, estudos anteriores descrevem que a presença de Sr^{2+} , tanto in vivo quanto in vitro, promove a formação de nódulos ósseos, aumento da massa óssea e consolidação do calo ósseo acelerado (ALMEIDA et al., 2016; AMMAN et al., 2004; LI et al., 2010). O benefício causado pela adição de Sr às formulações poderia ser explicado, pelo menos em parte, pela presença de receptor sensível ao cálcio nos osteoblastos. Esses receptores podem ser ativados por íons divalentes, como cálcio e estrôncio, resultando na ativação do metabolismo ósseo (ALMEIDA et al., 2016; COULOMBE et al., 2004; CAVERZASIO, 2008; CHATTPADHYAY et al., 2007; CAUDRILLIER et al., 2010; YAMAGUCHI, 2008).

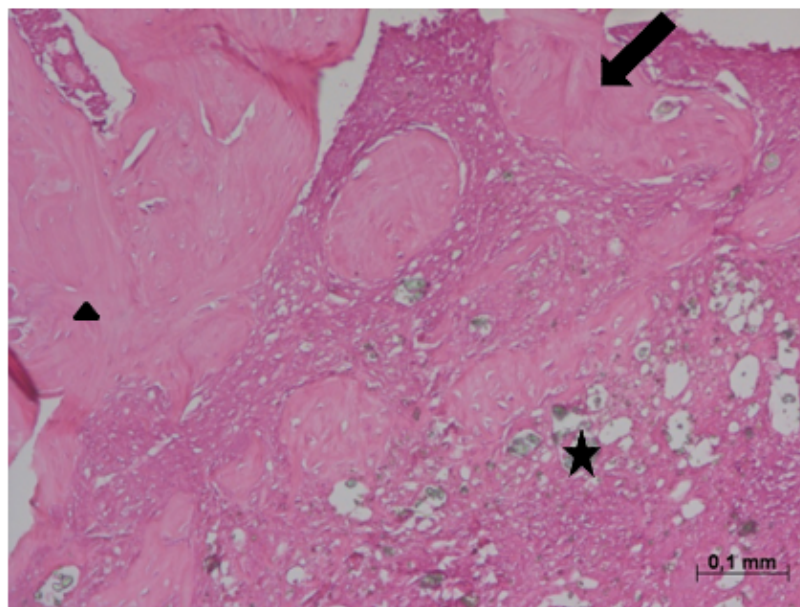
Por fim, nas análises histológicas, observadas em microscópio óptico (MO), foi possível verificar a neoformação óssea na interface com os diferentes materiais, sendo que este tecido exibiu aspecto de normalidade como verificado nas figuras de 28 a 33. Na análise histológica descritiva foram observados os aspectos do desenvolvimento da reparação óssea, avaliando-se a neoformação óssea e o arranjo das trabéculas ósseas imaturas constituídas por osteoblastos na periferia e osteócitos preenchendo as lacunas. Notou-se também a presença de linhas reversas que refletem a atividade de remodelação óssea.

Figura 28– Fotomicrografia em MO observada no grupo CH-7,5BG ampliado 2,5x. Detalhe da figura anterior da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (★), tecido ósseo neoformado (➡) e tecido ósseo pré-existente (▲).



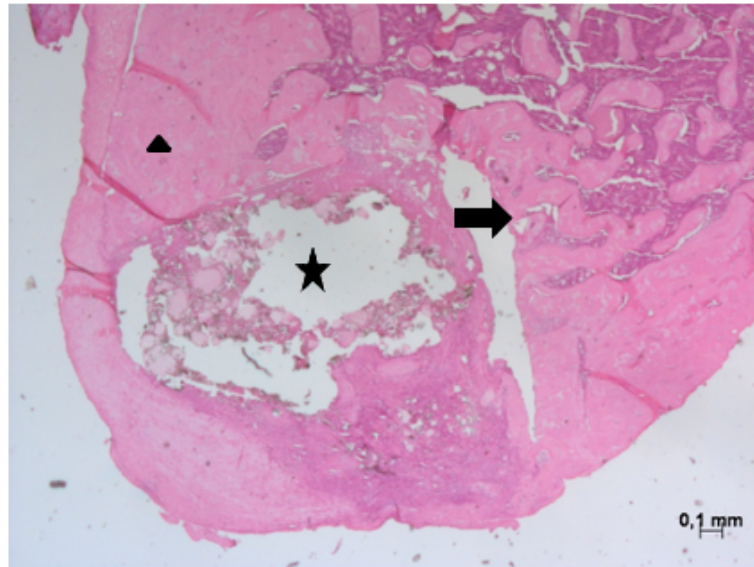
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29– Fotomicrografia em MO observada no grupo CH-7.5BG ampliado 10x. Detalhe da figura anterior da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (★), tecido ósseo neoformado (➡) e tecido ósseo pré-existente (▲).



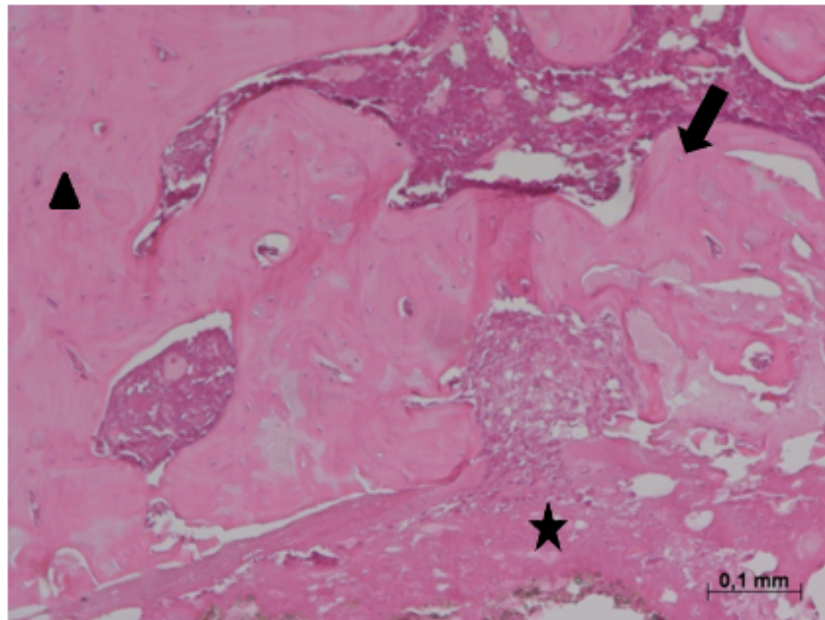
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 – Fotomicrografia em MO observada no grupo CH-7.5BG/Sr ampliado 2,5x. Fotomicrografia em microscópio óptico da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (★), tecido ósseo neoformado (➡) e tecido ósseo pré-existente (▲).



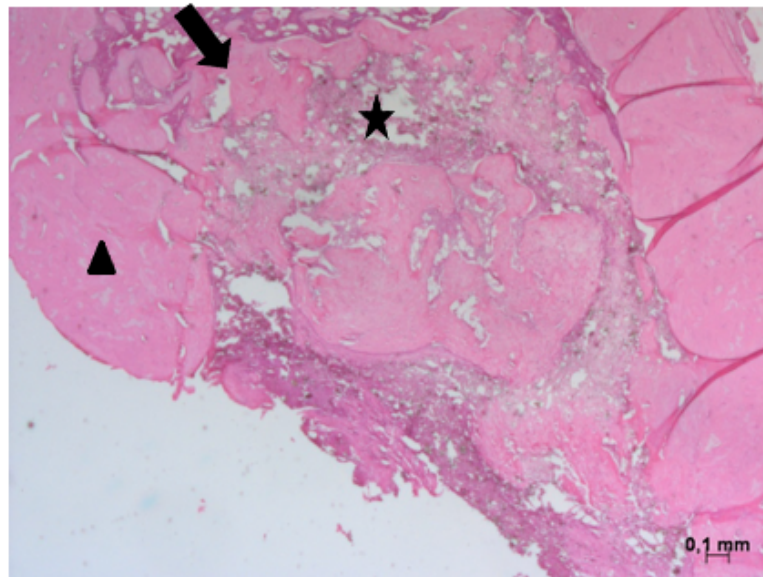
Fonte: O autor

Figura 31 - Fotomicrografia em MO observada no grupo CH-7.5BG/Sr ampliado 10x. Fotomicrografia em microscópio óptico, detalhe da Figura 30 da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (★), tecido ósseo neoformado (➡) e tecido ósseo pré-existente (▲).



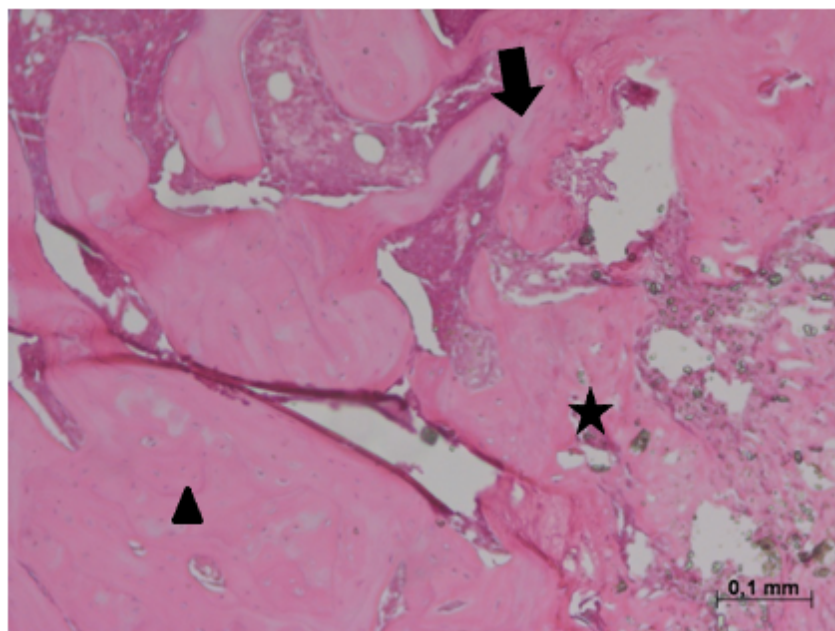
Fonte: o autor.

Figura 32- Fotomicrografia em MO observada no grupo CH ampliada 2,5x. Fotomicrografia em microscópio óptico da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (★), tecido ósseo neoformado (➡) e tecido ósseo pré-existente (▲).



Fonte: o autor.

Figura 33 - Fotomicrografia em MO observada no grupo CH ampliada 10x. Fotomicrografia em microscópio óptico, detalhe da figura anterior da área de defeito ósseo: local preenchido inicialmente pelo biomaterial (★), tecido ósseo neoformado (➡) e tecido ósseo pré-existente (▲).

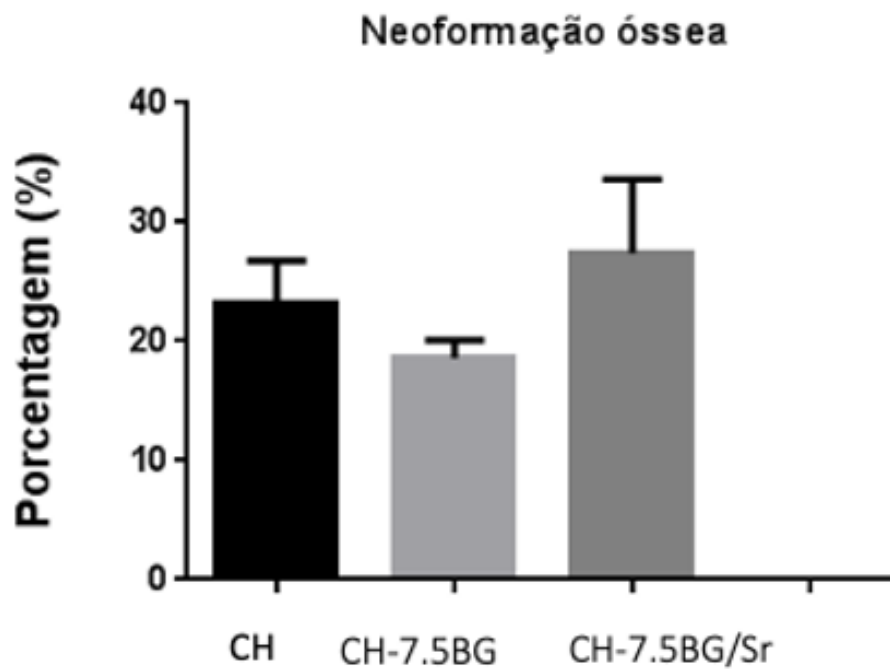


Fonte: o autor

Os resultados apresentados na Figura 34 referem-se à neoformação óssea na interface da região de inserção do biomaterial produzido com os materiais CH e suas blendas (vidro bioativo e vidro bioativo mais estrôncio).

Foi possível verificar a neoformação óssea na interface com os diferentes materiais empregados, sendo que o tecido formado exibiu aspecto de normalidade. Na análise histológica descritiva foram observados os aspectos do desenvolvimento da reparação óssea, verificando-se que a neoformação óssea e o arranjo das trabéculas ósseas imaturas preencheram as lacunas. A presença de linhas reversas observada, é um indicativo da atividade de remodelação óssea. A análise histomorfométrica realizada utilizando imagens de cortes histológicos realizados na área do defeito ósseo na qual houve a inserção do biomaterial, revelou que a neoformação óssea foi maior no defeito ósseo preenchido com CH/7,5%p BG58S e 1%-p de SrO. Entretanto, não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 34 – Gráfico de médias e desvio padrão (\pm) dos dados obtidos da neoformação óssea (%) na interface com os biomateriais CH, CH-7.5BG e CH-7.5BG/Sr.



Fonte: O autor.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo avaliou a influência da adição de BG em algumas propriedades do cimento homogêneo de aluminato de cálcio (CH). A adição de BG a CH tem pouco efeito sobre a densidade teórica de CH puro, independentemente do conteúdo de BG. Por outro lado, a adição de BG ao CH influencia principalmente suas propriedades mecânicas. A resistência mecânica do CH aumenta com a adição de BG devido ao melhor empacotamento das partículas, o que diminui a porosidade aparente antes do tratamento com SBF (10% em peso de BG). No entanto, a adição de níveis mais elevados de BG levou a uma redução na microdureza. Assim, pode-se sugerir que a blenda com 7,5% em peso de BG é a mais promissora resultando em menor porosidade aparente e tamanho de poro devido à presença de precipitados na superfície dos materiais em SBF. Além disso, as blendas com 7,5% em peso de BG sem e com Sr foram mais bioativas do que CH puro devido à precipitação de uma fase amorfa altamente solúvel a partir de 1 dia em SBF, conforme confirmado por meio de SEM/EDS. As análises de FTIR indicam a formação da fase apatita por meio do aumento da intensidade da banda correspondente ao grupo PO_4^{3-} após o tratamento com SBF e que a presença de estrôncio não inibe a formação da camada de fosfato de cálcio, mas retarda sua taxa de precipitação. No entanto, a fase de carbonato de cálcio cristalino é principalmente identificada por DRX porque provavelmente a fase de fosfato de cálcio precipitado é uma fase amorfa. Todas as blendas permitem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, uma vez que as culturas foram positivas para atividade de ALP e depósitos de mineralização da matriz. A formação da matriz mineralizada aumenta devido à inclusão de BG e Sr no CH promovendo o processo de osteogênese. Com relação aos testes *in vivo*, a análise histomorfométrica indica que a neoformação óssea é maior no defeito ósseo preenchido com CH-7.5BG/Sr.

Com base nos resultados obtidos durante a realização desse trabalho, existem fortes indicações que a melhor das blendas para futuras aplicações é aquela formada por CH/7,5%p BG58S e 1%-p de SrO.

REFERÊNCIAS

- ABUKAWA, H. et al. The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Scaffolds and Implant Coatings. **Dent Clin North Am**, n. 50, p. 205-216, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2005.11.006>
- AKERS, R. M.; DENBOW, D. M. **Bones and Skeletal System. Anatomy & Physiology of Domestic Animals**. Iowa: BlackwellPublishing, 2008.
- ALMEIDA, M. M. et al. Strontium ranelate increases osteoblast activity. **Tissue Cell.**, v. 48, n. 3, p. 183-8, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.03.009>
- AMMAN, P. et al. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. **J Bone Miner Res.**, v. 19, n. 12, p. 2012-20, 2004. <https://doi.org/10.1359/jbmr.040906>
- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 2, p. 191-198, 2006. Disponível em: <https://www.revodontolunesp.com.br/article/588017da7f8c9d0a098b493d/pdf/rou-35-2-191.pdf>. Acesso em: 15 set. 2021.
- ANDRADE, T. L. *et al.* Otimização da síntese das fases de cimento de aluminato de cálcio para fins biomédicos. **Cerâmica**, n. 60, p. 98-95, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0366-69132014000100013>
- ASLANKOOHI, N. *et al.* Bone repair and regenerative biomaterials: towards recapitulating the microenvironment. **Polymers (Basel)**, v.11, n. 9, p. 1437-68, 2019. doi: <https://doi.org/10.3390/polym11091437>
- AZEVEDO, V. V. C. *et al.* Materiais cerâmicos utilizados para implantes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, n. 6, p. 35-42, 2007. <http://www.dema.ufcg.edu.br/revista>
- BAKHTIARI, A. *et al.* Synthesis and characterization of the novel 80S bioactive glass: bioactivity, biocompatibility, cytotoxicity. **J. of Composites and Compounds**, v. 2, p. 110-114, 2020.
- BALAMURUGAN, A. *et al.* Development and in vitro characterization of sol-gel derived CaO-P₂O₅-SiO₂-ZnO bioglass. **Acta Biomater.**, v. 45, n. 4, p. 255-62, 2007. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.09.005>
- BALAMURUGAN, A. *et al.* Synthesis and characterization of sol gel derived bioactive glass for biomedical applications. **Mater Lett.**, v. 60, n. 5, p. 3752-7, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.03.102>
- BALA, Y. et al. Oral ibandronate in postmenopausal osteoporotic women alters micromechanical properties independently of changes in mineralization. **Calcif Tissue Int.**, v. 92, n. 1, p. 6-14, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9658-6>

- BUI, X. V. *et al.* Microspheres of chitosan-bioactive glass for application in orthopedic surgery. In vitro experiment. **Recent Research in Modern Medicine**, v. 17, n. 3, p. 359-67, 2011. Disponível em: <http://www.wseas.us/e-library/conferences/2011/Cambridge/MEDICAL/MEDICAL-45.pdf>. Acesso em: 20 set. 2021.
- BURGUER, C. P. Calcium Aluminate Cement- Use in bone defects induced in the femurs of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 749-765, 2013.
- CASTRO-RAUCCI, L. M. *et al.* Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. **Braz Dent J.**, v. 22, n. 2, p. 99-104, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402011000200002>
- CAVERZASIO, J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. **Bone**, v. 42, n. 6, p. 1131-6, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.02.010>
- CHATTPADHYAY, N. *et al.* The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. **Biochem Pharmacol.**, v. 74, n. 3, p. 438-47, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.04.020>
- CAUDRILLIER, A. *et al.* Strontium ranelate decreases receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-induced osteoclastic differentiation in vitro: involvement of the calcium-sensing receptor. **Mol Pharmacol.**, v. 78, n. 4, p. 569-76, 2010. <https://doi.org/10.1124/mol.109.063347>
- CESAR, R. *et al.* Axial compressive strength of human vertebral trabecular bones classified as normal, osteopenic and osteoporotic by quantitative ultrasonometry of calcaneus. **Res Biomed Eng.**, v. 33, n. 2, p. 91-7, 2017. <https://doi.org/10.1590/2446-4740.04116>
- CHEN, J. *et al.* Preparation and characterization of bioactive glass tablets and evaluation of bioactivity and cytotoxicity in vitro. **Bioactive Materials**, v. 3, p. 315-321, 2018.
- CORBI, S. C. T. *et al.* Caracterização radiográfica ex vivo de biomateriais utilizados para regeneração óssea em mandíbulas de porcos. **Rev. Odontol UNESP**, n. 41, p. 169-176, 2012. <https://www.revodontolunesp.com.br/article/588018fd7f8c9d0a098b4efe/pdf/rou-41-3-169.pdf>
- COULOMBE, J. *et al.* In vitro effects of strontium ranelate on the extracellular calcium-sensing receptor. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 323, n. 4, p. 1184-90, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.209>
- DAVIS, J. R. **Handbook of Materials for Medical Devices**. ASM International, 2003.
- DESHMUKH, K. *et al.* Recent advances and future perspectives of sol-gel derived porous bioactive glasses: a review. **RSC Advances**, n. 10, p. 33782-33835, 2020. <https://doi.org/10.1039/D0RA04287K>

DUCHEYENE, P.; LEMONS, J. E. **Bioceramics**: material characteristics versus in vivo behavior. New York: Ann NY Academy of Science, 1998.

DVORAK, M. M.; RICCARDI, D. Ca^{2+} as an extracellular signal in bone. **Cell Calcium.**, v. 35, n. 3, p. 249-55, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2003.10.014>

EMI, E. T. P. Caracterização das propriedades mecânicas de osso irradiado, utilizando ensaios destrutivos e não destrutivos. [Dissertação] Universidade Federal de Uberlândia, 2014

ENGQVUST, H. *et al.* Chemical stability of a novel injectable bioceramic for stabilisation of vertebral compression fractures. **Trends Biomater Artif. Organs**, n. 21, p. 98-106, 2008.

EREIBA, K. M. *et al.* Characterization of some bioactive glasses based on $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ quaternary system prepared by sol-gel method. **Nat Sci.**, v. 12, n. 5, p. 97- 105, 2014. <http://www.sciencepub.net/nature>

FROST, H. Skeletal Structural Adaptations to Mechanical Usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's Law: The Remodeling Problem, **The Anatomical Record**, v. 226, p. 414-422, 1990.

GARCIA-ÁLVAREZ, G. *et al.* Bioactivity and mechanical properties of scaffolds based on calcium aluminate and bioactive glass. **Int J Mater Res.**, v. 110, n. 4, p. 343-50, 2019. <https://doi.org/10.3139/146.111700>

GHANNAM, A. E. *et al.*, Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. **Journal Expert Rev. Med. Devices**, v. 34, n. 2, p. 87-101, 2005. doi: <https://doi.org/10.1586/17434440.2.1.87>

GORDAN, A. T. *et al.* Introduction to Nanotechnology: Potential applications in physical medicine and rehabilitation. **Am J Phys Med & Rehab**, n. 86, p. 225-241, 2007. <https://doi.org/10.1097/phm.0b013e318031ee1a>

GOUDARZI, Z. *et al.* Formation of hidroxiapatite on surface of $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-SrO-ZnO}$ bioactive glass synthesized through sol-gel-route. **Ceramics International**, v. 45, p. 19323-19330, 2019.

GRAÇA, G. Efeito da desmineralização óssea nas propriedades mecânicas do tecido cortical ósseo. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

HAVALDAR, R. *et al.* Insights into effects of tensile and compressive loadings on human femur done. **Adv Biomed Res.**, v. 25, n. 5, p. 101-11, 2014. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.129375>

HEJAZIA , M. S.; AHMADIANA, M. E. A. Effect of alumina contents on phase stability and mechanical properties of magnesium fluorapatite/alumina composites. **J Mec Beh of Biom Mat**, n. 8, p. 95-101, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.08.004>

HERMANSSON, L. Nanostructural chemically bonded Ca-Aluminate based bioceramics. *In*: PIGNATELLO, R. **Biomaterials: Physics and Chemistry**. London: IntechOpen; 2011. p. 47-74. doi: <https://doi.org/10.5772/24411>

HENCH, L.L.; WILSON, J. **An introduction to bioceramic Advanced series in ceramics**. Singapore: World Scientific Publishing Co, 1993.

HENKEL, J. *et al.* Bone Regeneration Based on Tissue Engineerin Conceptions – A 21st Century Perspective. **Bone Research**, p. 216-248, 2013.

HESARAKI, S. *et al.* Physico-chemical and in vitro biological evaluation of strontium/calcium silicophosphate glass. **J Mater Sci: Mater Med.**, v. 21, p. 695–705, 2010.

ISAAC, J. *et al.* Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells. **European Cells and Materials**, v. 21, p. 130-143, 2011.

ISLAN, M. T. *et al.* Bioactive calcium phosphate-based glasses and ceramics and their biomedical applications: a review. **J Tissue Eng.**, v. 38, n. 7, p. 1-16, 2017.
<https://doi.org/10.1177/2041731417719170>

ITO, A. *et al.* Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. **Journal Biomedical**, n. 50, p. 78-183, 2000.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(200005\)50:2%3C178::aid-jbm12%3E3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(200005)50:2%3C178::aid-jbm12%3E3.0.co;2-5)

JIMÉNEZ, M. *et al.* Bibliographic review on the state of the art of strontium and zinc based regenerative therapies. Recent developments and clinical applications, **J. Mater. Chem. B** v. 7, p. 1974-1985, 2019. <https://doi.org/10.1039/C8TB02738B>

JUDAS F. *et al.* Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina Disciplina de Ortopedia, março de 2012. Universidade de Coimbra.

JOHNSON, L. R. **Fundamentos de fisiologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. Tecido Ósseo. *In*: JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANE, R.; MA, P. X. Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone. **Mater. Today**, v. 16, n. 11, p. 418–423, 2013. Doi:
<https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.11.001>

KAUR, G. *et al.* Review and the state of the art: sol-gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 104, n. 6, p. 1248-75, 2016.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.33443>

KOPANDA, E.; MACZURA, G. Production processes properties and applications for calcium aluminate cements. *In*: HART, L. D. **Alumina chemicals science technology handbook**. Columbus: American Ceramic Society, 1990.

LAO, J. *et al.* New strontium-based bioactive glasses: physicochemical reactivity and delivering capability of biologically active dissolution products. **Journal of Materials Chemistry Royal Society of Chemistry**, v. 19, p. 2940-2949, 2009.

- LI, Y. F. *et al.* Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. **Osteoporos Int.**, v. 21, n. 11, p. 1889-97, 2010. doi: <https://doi.org/10.1007/s00198-009-1140-6>
- LOOF, J. **Calcium-aluminate as biomaterial**: synthesis, design and evaluation. Thesis. (mester) – Uppsala University, Sweden; 2008. Disponível em: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:172336/FULLTEXT01.pdf>. Acesso em: 25 set. 2021.
- LUZ, G. M.; MANO, J. F. Preparation and characterization of bioactive glass nanoparticles prepared by sol-gel for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 22, n. 4, p. 1-11, 2011. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/4/494014>
- MAÇON, A. L. B. *et al.* Synthesis and dissolution behaviour of CaO/SrO-containing sol-gel derived 58S glasses. **J Mater Sci.**, v. 52, n. 6, p. 8858-70, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0869-0>
- MAITRA, S. *et al.* Dehydration kinetics of calcium aluminate cement hydrate under non-isothermal conditions. **Ceram Int.**, v. 31, n. 3, p. 371-4, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2004.06.002>
- MATSUMOTO, S. *et al.* Calcium ions released from mineral trioxide aggregate convert the differentiation pathway of C2C12 cells into osteoblast lineage. **J Endod.**, v. 39, n. 1, p. 68-75, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.10.006>
- MOLDOVAN, M. *et al.* Structural and morphological properties of HA-ZnO powders prepared for biomaterials. **Open Chem**, n. 13, p. 725-733, 2015. <http://dx.doi.org/10.1515/chem-2015-0083>
- MOREJON-ALONSO, L. *et al.* Development and characterization of alfa-tricalcium phosphate /monocalcium aluminate composite bone cement. **J Biom Sci and Engi**, n. 5, p. 448-456, 2012. <http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2012.58057>
- MOGHANIAN, A. A comparative study on the in vitro formation of hydroxyapatite, cytotoxicity and antibacterial activity of 58S bioactive glass substituted by Li and Sr. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 91, p. 349-360, 2018.
- NAKAO, M. *et al.* Tolerance levels of mass density for CT number calibration in photon radiation therapy. **J Appl Clin Med Phys.**, v. 20, n. 6, p. 45-52, 2019. <https://doi.org/10.1002/acm2.12601>
- NARITA, H. *et al.* An explanation of the mineralization mechanism in osteoblasts induced by calcium hydroxide. **Acta Biomater.**, v. 6, n. 2, p. 586-90, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.08.005>
- NARASARAJU, T. S. B.; PHEBE, D. E. Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite. **J Mat Sci**, n. 31, p. 1-21, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00355120>

OLIVEIRA, I. R. *et al.* Surface properties of calcium aluminate cement blends for bone repair applications. **Ceram Int.**, v. 46, n. 9, p. 14241-51, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.02.033>

OLIVEIRA, I. R. *et al.* Hydroxyapatite synthesis and the benefits of its blend with calcium aluminate cement. **Ceram Int.**, v. 42, n. 5, p. 2542-9, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.10.056>

OLIVEIRA, I. R. *et al.* Bioactivity of calcium aluminate endodontic cement. **J. Endod.**, n. 39, p. 774-778, 2013.

OLIVEIRA, I. R. *et al.* Characterization of calcium aluminate cement phases when in contact with simulated body fluid. **Mater Res.**, v. 18, n. 2, p. 382-9, 2015. <https://doi.org/10.1590/1516-1439.336714>

OLIVEIRA, I. R. *et al.* Improving the radiopacity of calcium aluminate cement based blends. **Mater Res.**, v. 21, n. 2, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2017-0599>

ORAL, Ç. M.; ERCAN, B. Influence of pH on morphology, size and polymorph of room temperature synthesized calcium carbonate particles. **Powder Technol.**, v. 339, n. 12, p. 781-8, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.08.066>

ORRENIUS, S. *et al.* Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 4, n. 7, p. 552-65, 2003. <https://doi.org/10.1038/nrm1150>

PARIDA, P. *et al.* Classification of Biomaterials used in Medicine, **International Journal of Advances in Applied Sciences (IJAAS)**, v.1, p. 31-35, 2012.

PENA, P.; AZA, A. H. Cemento aluminatos calcios, constitución, características y aplicaciones. **Boletín de la Sociedad Española de Ceramicos y Vidrios**, n. 42, p. 1-86, 2011. <http://dx.doi.org/10.3989/cyv.2003.v42.i5.631>

QUERIDO, W. *et al.* The effects of strontium on bone mineral: a review on current knowledge and microanalytical approaches. **Micron.**, v. 80, n. 5, p. 122-34, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2015.10.006>

QIU, Q. *et al.* New bioactive, degradable composite microspheres as tissue engineering substrates. **J Biomed Mater Res.**, v. 52, n. 8, p. 66-76, 2000. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200010\)52:1%3C66::aid-jbm9%3E3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200010)52:1%3C66::aid-jbm9%3E3.0.co;2-2)

RADWAN, M. M. *et al.* Evaluation of Calcium Aluminate/Calcium Phosphate Based Bio Cements as Root-end Filling Material. **Orient. J. of Chem.**, v. 33, n. 6, p. 98-122. <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/330602>

RAUT, H. K. *et al.* Biocompatibility of biomaterials for tissue regeneration or replacement. **Biotechnol J.**, v. 15, n. 12, p. 145-51, 2020. doi: <http://doi.org/10.1002/biot.202000160>

- RAVARIAN, R. *et al.* Synthesis, characterization, and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. **Ceram Int.**, v. 36, n. 6, p. 291-7, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2009.09.016>
- REZAEI, Y. *et al.* Synthesis, characterization, and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO-SrO bioactive glass. **Synth React Inorg Met-Org Nano-Met Chem.**, v. 44, n. 5, p. 692-701, 2014. doi: <https://doi.org/10.1080/15533174.2013.783869>
- RIDDLE, R.C.; CLEMENS, T.L. Bone Cell Bioenergetics and Skeletal Energy Homeostasis. **Physiol. Rev.**, v. 97, n. 2, p. 667-698, 2017. doi: 10.1152/physrev.00022.2016.
- RIGO, E.C.S. *et al.* Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. **Mat. Sci. and Eng.**, v. 24, n. 5, p. 647-651, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2004.08.044>
- ROEMHILDT, M. L.; MCGEE, T. D.; WAGNER, S. D. Novel calcium phosphate composite bone cement: strength and bonding properties. **J Mat Sci: Mat in Med**, v. 14, n. 2, p. 137-141, 2003. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0539-2>
- SALOMÃO, R. *et al.* Adição de cimento de aluminato de cálcio e seus efeitos. **Cerâmica**, v. 56, p. 135-110, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0366-69132010000200007>
- SANTOS, K.S. **Princípios da cicatrização óssea** (Revisão de literatura). 2011. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Coimbra, Coimbra, 2011.
- SOUZA, K. G. *et al.* A Influência do Zinco no Reparo Ósseo: Uma Revisão de Literatura, **Rev. Virtual Quim.**, v.10, n. 3, p. 474-486, 2018.
- SEABRA, D. E. A. **Studies of bioactivity of zinc oxide nanostructures**. Dissertation (master) - Aveiro University, Aveiro, 2013.
- SEITZ, H. *et al.* Different Calcium Phosphate Granules for 3-D Printing of Bone Tissue Engineering Scaffolds., **Advan. Eng. Biomat.**, n. 11, p. 42-46, 2009. <https://doi.org/10.1002/adem.200800334>
- SEPULVEDA, P. *et al.* Bioactive sol-gel foams for tissue repair. **J Mater Sci Mater Research**. 59 (2002) 340-348. <https://doi.org/10.1002/jbm.1250>
- TAHERKHANI, F. *et al.* Influence of strontium on the structure and biological properties of sol-gel-derived mesoporous bioactive glass (MBG) powder. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 78, n. 3, p. 539-549, 2016.
- TENGJIAO, Z. *et al.* Novel bioactive glass based injectable bone cement with improved osteoinductivity and its in vivo evaluation. **Sci Rep.**, v. 34, n. 7, p. 3622-31, 2017. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03207-9>
- TORMENA, F. V. Um modelo de remodelamento ósseo utilizando potenciais termodinâmicos generalizados. 2009. Tese de Doutorado em Engenharia- PPGMNE – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná.

USUDA, K. *et al.* An overview of boron, lithium, and strontium in human health and profiles of these elements in urine of Japanese. **Environ Health Prev Med.**, v. 12, n. 6, p. 231-7, 2007. doi <https://dx.doi.org/10.1007%2FBF02898029>

VASCONCELLOS, L. M. R. *et al.* Biological and microbiological behavior of calcium aluminate cement-based blend for filling of bone defects. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 31, n. 10, p.1-10, 2020. doi: <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6348-1>

VERGNOL, G. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of a polylactic acid-bioactive glass composite for bone fixation devices. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 104, n. 1, p. 180-91, 2016. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33364>

UNITED NATIONS. **Populational Division:** World Populational Prospects 2019. Disponível em: <https://population.un.org/wpp/>. Acesso em: 10 out. 2021.

WAN, D. C *et al.*, Craniofacial Bone Tissue Engineering. Elsevier Saunders, **Dent. Clin. North. Am.**, n. 50, p. 175-190, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2005.11.003>

WANG, W.; YEUNG, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review. **Bioact Mater.**, v. 2, n. 4, p. 224-47, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>

WERS, E. **Elaboration d'un biomatériau poreux à base d'une matrice vitreuse induisant le phénomène d'ostéoconduction.** 2014. 340 p. Tese (Doutorado em ciências dos materiais) – Instituto de Ciências Químicas de Rennes, Universidade de Rennes, França. 2014.

WU, C. *et al.* Bioactive mesopore-glass microspheres with controllable protein delivery properties by biomimetic surface modification. **J Biomed Mater Res A.**, n. 95A, p. 476-85, 2010.

YAMAGUCHI, T. The calcium-sensing receptor in bone. **J Bone Miner Metab.**, v. 26, n. 4, p. 301-11, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00774-008-0843-7>

ZHANG, K.; VAN LE, Q. Bioactive glass coated zirconia for dental implants. **J. of Composites and Compounds.**, v. 2, n. 2, p. 10-17, 2020.

ZHONG, D. Greenspan, Processing and properties of sol-gel bioactive glasses. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 53, p. 694-701, 2000.