



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Física

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação da bioatividade e desempenho biológico *in vitro* do sistema vítreo cálcio-boro-sódio em pó

Mestrando: Marcos William Crisóstomo Silva

Orientadora: Prof^a Dra. Francielle Sato

Maringá, 25 de junho de 2025



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Física

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação da bioatividade e desempenho biológico *in vitro* do sistema vítreo cálcio-boro-sódio em pó

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Física.

Mestrando: Marcos William Crisóstomo Silva

Orientadora: Prof^a Dra. Francielle Sato

Maringá, 25 de junho de 2025

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

S586a

Silva, Marcos William Crisóstomo

Avaliação da bioatividade e desempenho biológico in vitro do sistema vítreo cálcio-boro-sódio em pó / Marcos William Crisóstomo Silva. -- Maringá, PR, 2025.
89 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2025.

1. Biomateriais. 2. Fibroblastos. 3. Vidro bioativo de borato. 4. Cicatrização de feridas .
5. Fluido corporal simulado. I. Sato, Francielle, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDD 23.ed. 530.413

MARCOS WILLIAM CRISÓSTOMO SILVA

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE E DESEMPENHO BIOLÓGICO *IN VITRO* DO
SISTEMA VÍTREO BIOATIVO CÁLCIO-BORO-SÓDIO EM PÓ**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Aprovado em: Maringá, 30 de abril de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Francielle Sato
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof^ª. Dr^ª. Andressa Novatski
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

Prof^ª. Dr^ª. Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali
Universidade Estadual de Maringá – UEM

*"Not only is the universe
stranger than we think, it's
stranger than we can think."*

Werner Heinsenberg

*"So oft in theologic wars,
The disputants, I ween,
Rail on in utter ignorance
Of what each other mean,
And prate about an Elephant
Not one of them has seen!"*

John Godfrey Saxe, *The Blind
Men and The Elephant.*

Dedicatória

Ao Professor Wilson Ricardo Weinand (*in memoriam*) cuja mente brilhante e incansável de curiosidade ajudaram a iluminar os caminhos da ciência. Seu legado vive nas suas descobertas e aprendizados que transformou a todos nós do PFI. Que possamos atingir uma fração de todo seu conhecimento, curiosidade e moral.

Com gratidão e admiração eternas.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Francielle Sato, por todo o conhecimento compartilhado comigo ao longo destes dois anos.

Sou extremamente grato também a todos os professores do programa de pós graduação em Física que me auxiliaram, Prof. Dr. Antonio Medina Neto, Prof. Dr. Vitor Santaella Zanuto, Prof. Dr. Danilo D. Luders e demais integrantes do DFI e PFI. Um agradecimento especial para a secretária Mônica por sempre estar à disposição para auxiliar os alunos da pós graduação.

De forma especial, agradeço ao Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand (*in memoriam*), o qual pude compartilhar de pouco tempo ao seu lado, mas recheado de muito conhecimento e aprendizados.

Agradeço à todos os docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas e do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, que sempre me receberam tão bem, compartilhando do espaço e de muito conhecimento comigo. Um agradecimento em especial à técnica Valéria e as professoras Maria Ida e Kellen Brunaldi, que desde a graduação fundamentaram muito de quem sou hoje cientificamente, e a doutoranda Amanda Gratão que me auxiliou tanto nesta etapa.

Agradeço ao Henrique dos Santos, a Sophia Assis, a Mariana Gibin, a professora Ana Mulati, a Monique, o Fábio e o Leonardo e a todos outros colegas de laboratório, do GEOPT e GEF, que fizeram parte desta etapa, auxiliando diretamente ou indiretamente neste trabalho. Sou eternamente grato à todos! Ainda, sou imensamente grato a Mayra, minha companheira, por todo amor e compreensão! Te amo!

Gratidão ao Grupo de Estudos Multidisciplinares do Ambiente (GEMA) por disponi-

bilizar o uso do granulômetro, ao Grupo de Desenvolvimento de Dispositivos Multifuncionais (GDDM) por fornecer acesso ao difratômetro de raios X, ao professor João Palazzo do Departamento de Farmácia pelo fornecimento das células L-929 e ao Professor João Carlos Silos de Moraes de UNESP-Ilha Solteira pelas medidas de DSC.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por incentivar e conceder suporte financeiro à pesquisa por meio das bolsas, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), à Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) responsáveis pelo financiamento e infraestrutura disponível para a realização deste trabalho.

Resumo

O presente trabalho avaliou a bioatividade e o desempenho biológico *in vitro* do sistema vítreo bioativo $60\text{ B}_2\text{O}_3-5\text{ CaF}_2-19\text{ Na}_2\text{O}-14\text{ CaO}-2\text{ P}_2\text{O}_5$ (60B5F2P) em pó, comparando-o com vidros bioativos de silicato (45S5) e borato (13.93-B3) disponíveis comercialmente. Todos os vidros foram produzidos pelo método de fusão/resfriamento e tamisados em $280\ \mu\text{m}$. A difratometria de Raios X e a calorimetria exploratório diferencial foram utilizadas para a avaliação da formação vítrea dos vidros bioativos. Para o ensaio de bioatividade, *in vitro*, os vidros foram submetidos à imersão em fluido corporal simulado por diferentes períodos, totalizando 336 horas. Após cada período de imersão, os biomateriais foram analisados utilizando as espectroscopias Raman e de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, além da difratometria de Raios X. Os resultados mostraram dissolução dos vidros e a formação de fosfato de cálcio, demonstrando que o vidro 60B5F2P apresentou formação mais cristalina. Os estudos biológicos, também *in vitro*, que incluíram testes de viabilidade celular por MTT e ensaio de migração e proliferação celular (*scratch assay*), utilizando fibroblastos da linhagem L-929, mostraram que os vidros borato não apresentaram diferenças de citotoxicidade, proliferação e migração entre si. Os resultados sugerem que o vidro 60B5F2P possui características promissoras como biomaterial para aplicações em regeneração tecidual, demonstrando boa bioatividade e compatibilidade celular.

Palavras chaves: Fluido Corporal Simulado, Vidro Bioativo de Borato, Fibroblastos, Cicatrização de ferida

Abstract

The present study evaluated *in vitro* bioactivity and biological performance of the powdered bioactive glass system 60 B₂O₃–5 CaF₂–19 Na₂O– 14 CaO–2 P₂O₅ (60B5F2P), comparing it with commercially available silicate (45S5) and borate (13-93B3) bioactive glasses. All glasses were produced using the melt-quenching method sieved into 280 μm. X-ray diffraction and differential scanning calorimetry were used to assess the glass formation of the bioactive glasses. For the *in vitro* bioactivity test, the glasses were immersed in simulated body fluid for different periods, totaling 336 hours. After each immersion period, the biomaterial were analyzed using Raman spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy, and X-ray diffraction. The results showed glass dissolution and calcium phosphate formation, indicating that the 60B5F2P glass exhibited more crystalline formation. The *in vitro* biological studies, including cell viability assays using MTT and cell migration and proliferation assays (scratch assay) with L-929 fibroblast cells, showed that the borate materials did not present significant differences in cytotoxicity, proliferation or migration. The results suggest that the 60B5F2P glass has promising characteristics as a biomaterial for tissue regeneration applications, demonstrating good bioactivity and cellular compatibility.

Keywords: Simulated Body Fluid, Bioactive Borate Glass, Fibroblast, Wound Healing.

Lista de Símbolos

β -TGF Fator de transformação de crescimento β

ΔT Coeficiente de estabilidade térmica

T_C Temperatura de pico de cristalização

T_G Temperatura de transição vítrea

T_M Temperatura de fusão

T_X Temperatura de início de cristalização

ATR Reflectância Total Atenuada

BO *Bridging Oxygen* (Oxigênio ponte)

COMCAP Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO Dimetilsulfóxido

DPBS *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* - Salina Tamponada de Fosfato de Dulbecco

DRX Difractometria de raios X

DSC-TGA Calorimetria exploratória diferencial - Análise termogravimétrica

ECM Matriz extracelular

EGF Fator de crescimento epidérmico

FAp Fluorapatita

FBS *Fetal Bovine Serum* - Soro Bovino Fetal

FTIR Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

GEMA Grupo de Estudos Multidisciplinares do Ambiente

HAp Hidroxiapatita

HCA Hidroxicarbonato de apatita

JCPDS *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*

MMP metaloproteínase

MTT 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-Difenil-tetrazólio

NBO *Non-Bridging Oxygen* (Oxigênio não-ponte)

SBF *Simulated Body Fluid* (Fluído Corporal Simulado)

TIMPs Inibidores teciduais de metalaproteínase

TLR *Toll-like Receptors* - Receptores do tipo Toll

TNF- α Fator de necrose tumoral α

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de Figuras

1.1	Esquematisação dos diferentes tipos de arranjos atômicos em sólidos. Em a) Arranjo atômico de sólidos cristalinos com periodicidade em curta distância. b) Exemplo de um sólido amorfo (vidro), sem periodicidade e simetria.	6
1.2	Efeito da temperatura na entalpia no processo de formação vítrea. Adaptado da referência [1].	6
1.3	Processo de degradação do vidro bioativo de silicato e formação de camadas de hidroxicarbonato de apatita (HCA) após imersão em SBF. Adaptado de [2].	11
1.4	Processo de degradação do vidro bioativo de borato e formação de camadas de apatita após imersão em SBF. Adaptado de [2].	13
2.1	Rampas de aquecimento dos materiais para o processo de manufatura dos vidros bioativos.	21
2.2	Monocamada de células L-929 aderidas em frasco de cultivo em confluência.	26
2.3	Esquema da placa de 96 poços para o teste de MTT. As regiões destacadas (colunas) em verde, cinza, vermelho e azul mostram as posições dos grupos controle, 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P, respectivamente, em concentrações de 100, 400, 700 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ (linhas). As colunas em preto são poços não utilizados.	27

2.4	Em a) Esquema da placa de 96 poços para o teste de ferida. As regiões destacadas (linhas) em verde, cinza, vermelho e azul mostram as posições dos grupos controle, 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P, respectivamente, em concentrações de 100 μg . Os poços de A até D são poços suplementados com meio pobre em FBS (5%) e os poços de E até H suplementados com meio rico em FBS (10%). b) Exemplo de poço com células aderidas e ponteira de 10 μ utilizada para realização da ferida. c) Poço com células aderidas e com a ranhura delimitada em vermelho para melhor visualização.	28
2.5	Exemplo de determinação de área de uma ferida em uma monocamada de células aderidas. No canto inferior direito, em vermelho, a barra de escala de 100 μm	29
3.1	Distribuição de tamanho de partícula para as amostras de vidro bioativos: 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5, após o peneiramento em peneira de faixas de <i>mesh</i> de 180 a 250 μm	33
3.2	Difratogramas de raios X dos vidros 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P.	34
3.3	Termogramas obtidos para os vidros bioativos 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P, com taxa de aquecimento 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, em atmosfera de nitrogênio. As regiões pontilhadas destacam as temperaturas características dos vidros. Os detalhes mostram a) a região de T_G , b) e c) as regiões de T_X e os picos de T_C e d) a região de T_M . A intersecção das retas determinam as temperaturas de início das mudanças estruturais.	35
3.4	Espectros Raman normalizados das amostras vítreas: 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P.	37
3.5	Espectros FTIR-ATR normalizados dos vidros bioativos: 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P.	39
3.6	Comportamento dos vidros 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P em função do tempo de imersão ($n = 3$): (A) variação de pH da solução de imersão e (B) perda de massa percentual dos vidros. As linhas são guias visuais. No tempo igual a zero (pré-imersão) o pH do SBF é igual a 7,4.	42

3.7	Espectros Raman normalizados dos vidros bioativos em diferentes períodos de imersão em SBF comparados com o espectro da hidroxiapatita (HAp). Em a) 60B5F2P, b) 13.93-B3 e c) 45S5. Os símbolos *, Δ , \diamond e \bullet indicam as alterações nas bandas de fosfato (PO_4^{3-}), borato (BO_3 e BO_4), silicato (SiO) e carbonato (CO_3^{2-}), respectivamente.	43
3.8	Espectros de FTIR-ATR normalizados dos vidros bioativos: a) 60B5F2P, b)13.93-B3 e c) 45S5 em diferentes períodos de imersão em SBF. Os símbolos *, Δ , \diamond e \bullet indicam as alterações nas bandas de fosfato (PO_4^{3-}), borato (BO_3 e BO_4), silicato (SiO) e carbonato (CO_3^{2-}), respectivamente	45
3.9	Difratogramas dos vidros bioativos: a) 60B5F2P, b) 13.93-B3 e c) 45S5 para diferentes tempos de imersão em SBF.	47
3.10	Difratograma das amostras 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5 em 336 horas de imersão em SBF, comparados a hidroxiapatita (HAp). Os símbolos representam os picos mais intensos da HAp (JCPDS 09-0432).	48
3.11	Viabilidade celular nas concentrações de 100, 400, 700 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ dos vidros bioativos: (A) 60B5F2P, (B) 13.93-B3 e (C) 45S5 com incubações em 1, 12 e 24 horas. Os valores representam a média de um total de $n=6$ e estes dados estão expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) da porcentagem relativa, adotando-se o controle como 100% da viabilidade. Os símbolos *, **, *** e **** denota diferença com significância de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente, do grupo de amostra <i>versus</i> grupo controle, obtido por meio do teste estatístico de ANOVA 1 fator e teste de Krusal-Wallis.	49
3.12	Imagens representativas dos experimentos realizados para análise do teste de ferida <i>in vitro</i> em cultura celular de células L-929 cultivadas em monocamada com os grupos controle, 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P em meio com 5% e 10% de FBS.	51

3.13 Área percentual coberta pelas células após o período de 72 horas. O símbolo * denota diferença estatística entre amostra *versus* 45S5 (***, **** sendo $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente), e ● representa diferença estatística entre amostra *versus* grupo controle (●, ●●●, ●●●● sendo $p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente). 52

Lista de Tabelas

2.1	Descrição dos reagentes em porcentagem de massa e mol utilizados para a preparação das amostras.	20
2.2	Reagentes utilizados para a produção de Fluido Corporal Simulado [3]. . .	24
3.1	Caracterização térmica dos vidros bioativos estudados, em pó, obtido a partir do termograma das análises de DSC.	35
3.2	Atribuição química das principais bandas de espectroscopia Raman presentes nos espectros dos vidros 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5 [4–8].	38
3.3	Atribuição química das principais bandas de FTIR-ATR presentes nos espectros dos vidros 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5 [4, 5, 9–12]	40

Sumário

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xiii
Introdução	4
1 Desenvolvimento teórico	5
1.1 Vidros	5
1.2 Biomateriais	9
1.2.1 Vidros Bioativos	10
1.3 O papel dos elementos químicos no processo de cicatrização	17
2 Materiais e Métodos	19
2.1 Preparação dos vidros bioativos	19
2.2 Parâmetros experimentais	22
2.2.1 Análise térmica	22
2.2.2 Análise de tamanho de partícula	22
2.2.3 Difractometria de raios X (DRX)	22

2.2.4	Espectroscopia Raman	23
2.2.5	Espectroscopia FTIR-ATR	23
2.3	Teste de bioatividade <i>in vitro</i>	23
2.4	Ensaio biológico <i>in vitro</i>	25
2.4.1	Cultivo celular	25
2.4.2	Avaliação da viabilidade Celular pelo método MTT	26
2.4.3	Teste de ferida (<i>Scratch assay</i>)	28
2.4.4	Testes estatísticos	30
3	Resultados e Discussão	32
3.1	Caracterização dos Materiais	32
3.1.1	Tamanho de Partícula	32
3.1.2	Difratometria de raios X	33
3.1.3	Análise Térmica	34
3.1.4	Espectroscopia Raman	36
3.1.5	Espectroscopia FTIR-ATR	38
3.2	Pós-Imersão	39
3.2.1	Análise de pH e perda de massa	40
3.2.2	Espectroscopia Raman	43
3.2.3	Espectroscopia FTIR-ATR	44
3.2.4	Difratometria de raios X	46
3.3	Avaliações biológicas <i>in vitro</i>	48
3.3.1	Avaliação de Viabilidade Celular por MTT	49
3.3.2	Teste de Ferida	51
4	Conclusão	54
	Referências Bibliográficas	62

Introdução

Desde os períodos da antiguidade, o ser humano sempre procurou meios de se adequar aos efeitos da natureza, melhorando as probabilidades de sobrevivência da espécie e aumentando a longevidade da vida humana. Para isto, a humanidade procurou utilizar de materiais disponíveis na natureza para realizar as melhorias. Como exemplo, há evidências de uso de implantes dentários na antiguidade [13].

Rupturas ou lesões na integridade da pele ou de outros tecidos são feridas que podem comprometer a função dos tecidos [14, 15]. As feridas são um problema de saúde significativo em todo o mundo. Muitas feridas podem não se recuperar mesmo um ano após o ferimento [16], e feridas crônicas, causadas por problemas fisiopatológicos, podem ser um desafio para os profissionais de medicina e pacientes [17].

O desenvolvimento de materiais que apresentem baixa rejeição pelo organismo e que possam auxiliar no processo de cicatrização é uma dificuldade enfrentada em todo o mundo. O vidro bioativo foi o primeiro exemplo de material, feito por humanos, com a capacidade de se ligar em tecidos vivos [18]. Originalmente, foram desenvolvidos com um sistema à base de silicato para auxiliar na correção de defeitos ósseos [19] e, posteriormente, outras bases de vidros bioativos foram desenvolvidos para diferentes finalidades [20].

A grande vantagem dos vidros em relação aos outros biomateriais está na bioatividade, permitindo que esses materiais formem fortes ligações com os tecidos vivos, resultado a partir da formação de camada de fosfato de cálcio cristalino. Ainda, estes vidros possuem alta biocompatibilidade, oferecendo pouca ou nenhuma reação adversa significativa no indivíduo [21].

Os vidros bioativos de borato possuem, essencialmente, uma menor estabilidade quí-

mica, oferecendo maior taxa de degradação quando comparados ao de silicato. Isto pode ser vantajoso quando é desejável que ocorra uma rápida liberação dos íons bioativos e uma substituição mais rápida dos tecidos [22]. Esses biomateriais também apresentam propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, o que os torna promissores para diversas aplicações na área da medicina regenerativa [20]. Além disso, a morfologia do vidro bioativo influencia na finalidade da aplicação biomédica desejada, podendo serem utilizados como parte de uma solução para a formação de cimento ósseo, em nanofibras para curativos, e na forma de arcabouços porosos, os *scaffolds*, para aplicação direta em defeitos ósseos [21, 23].

Há investigações científicas acerca dos efeitos de pH na reatividade do vidro silicato 45S5, comercialmente disponível, mostrando que algumas etapas de dissolução levam à formação de camadas de fosfato de cálcio na superfície do vidro bioativo, especialmente, quando pequenas partículas ($< 2 \text{ mm}$) são dissolvidas [24]. Em estudos subsequentes, indicaram que a precipitação rápida de uma camada de fosfato de cálcio está associada à maior energia de superfície das partículas menores, podendo retardar o processo de difusão [25]. Outros estudos avaliaram a influência do tamanho da partícula mostraram que partículas grandes tendem a provocar maior resposta inflamatória e partículas menores ocasiona em maior taxa de absorção do biomaterial pelo organismo [26, 27].

Tendo em vista da influência morfológica do biomaterial, este trabalho propõe o estudo do vidro bioativo 60B5F2P, do sistema vítreo $60 \text{ B}_2\text{O}_3 - 5 \text{ CaF}_2 - 19 \text{ Na}_2\text{O} - 15 \text{ CaO} - 2 \text{ P}_2\text{O}_5$, em forma de pó, para avaliar a resposta bioativa e as respostas biológicas em células de fibroblastos e compará-lo com dois vidros bioativos já utilizados comercialmente: o vidro 45S5 desenvolvido por Larry Hench [19] e o 13.93-B3 desenvolvido por Steven Jung e Delbert Day [23], à base de borato, obtido por meio da técnica de fusão, e mais comumente estudado para aplicações biomédicas [21]. Para avaliar a resposta bioativa do 60B5F2P foram empregadas diferentes técnicas, desde de caracterização da estrutura molecular à dinâmica de bioatividade, além de ensaios *in vitro*, em células de fibroblastos avaliando o desempenho biológico, comparando os resultados aos vidros 45S5 e 13.93-B3.

Este trabalho se inicia no Capítulo 1 com o desenvolvimento teórico, no qual há uma

revisão bibliográfica sobre o tema, seguido do Capítulo 2 que apresenta as técnicas e os parâmetros experimentais utilizados. No Capítulo 3 encontram-se os resultados obtidos neste estudo, devidamente discutido. E por fim, a Conclusão do trabalho.

Desenvolvimento teórico

Neste capítulo há uma breve fundamentação teórica com tópicos importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

1.1 Vidros

Historicamente, a presença de vidros no ambiente humano data desde a antiguidade. A exemplo disso, tem-se que os primeiros humanos se utilizavam de vidro de formação natural, a obsidiana, para fazer ferramentas rudimentares, e os egípcios da antiguidade (7000 a.C.) consideravam vidros como materiais preciosos [1]. Com o avanço da humanidade, o vidro passou a ser um dos materiais mais pertencentes ao dia a dia, com inúmeras aplicações práticas e até puramente estéticas, principalmente por terem a capacidade de permitirem a passagem de luz.

Frequentemente, os vidros utilizados ao longo da história da humanidade e em nosso cotidiano são majoritariamente compostos de sílica e produzidos pelo método de fusão/resfriamento, sendo esse o tipo mais comum. No entanto, também existem vidros fabricados a partir de boratos e até mesmo de compostos metálicos. Além disso, há vidros obtidos por outras técnicas de produção, como o processo de *sol-gel* [1].

Uma vez que os materiais e as técnicas utilizadas para a produção de vidros podem ser diferentes, faz-se necessário entender quais são as características comuns a todos os tipos de vidros.

Todos os vidros são amorfos. Isto é, possuem arranjos atômicos curtos e sem periodicidade. Desta forma, eles são comumente denominados de sólidos amorfos se assemelhando

a líquidos, em contraste com os sólidos cristalinos que possuem cadeias com arranjos atômicos longos e periódicos [1,28]. A Figura 1.1 mostra representações de arranjos atômicos de sólidos cristalinos e amorfos.

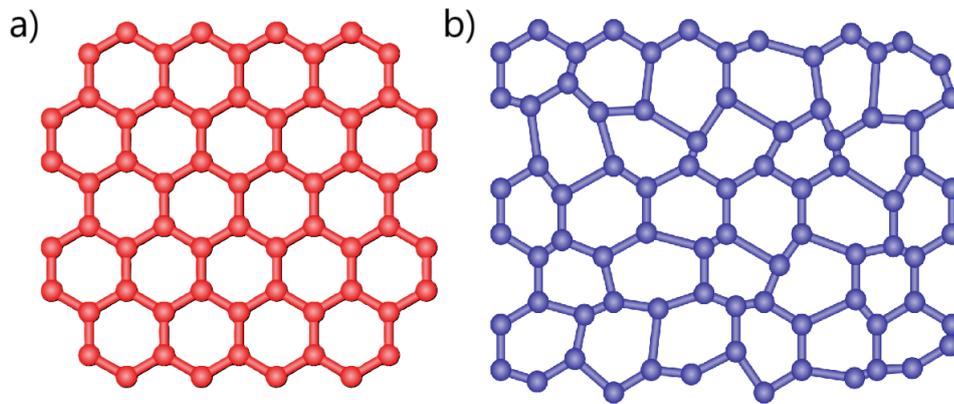


Figura 1.1: Esquemática dos diferentes tipos de arranjos atômicos em sólidos. Em a) Arranjo atômico de sólidos cristalinos com periodicidade em curta distância. b) Exemplo de um sólido amorfo (vidro), sem periodicidade e simetria.

Todos os vidros exibem um comportamento de transformação vítrea dependente do tempo, ocorrendo em uma região de temperatura denominada temperatura de transição vítrea, ou T_G . Para uma melhor visualização, a Figura 1.2 apresenta um diagrama da entalpia em função da temperatura, no qual, podemos observar as transformações de um vidro, do estado líquido para sólido [1, 28].

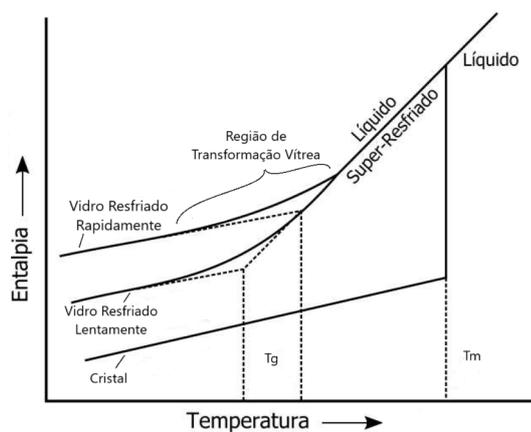


Figura 1.2: Efeito da temperatura na entalpia no processo de formação vítrea. Adaptado da referência [1].

Pode-se observar que ao passar pela temperatura de fusão do material (T_M), pode ocorrer uma queda brusca na entalpia, podendo então resultar em um rearranjo atômico com

formações de cadeias longas e periódicas, tornando-se um sólido cristalino. Entretanto, ao resfriar o material e passar pela temperatura T_M , com uma diminuição gradual da entalpia, então este material é chamado de líquido super-resfriado, que apresenta aumento na viscosidade com a diminuição da temperatura. A viscosidade se torna tão grande, que por sua vez impede novos rearranjos atômicos e a formação de cadeias longas e periódicas, formando um material sólido amorfo [1].

Quando no ponto de fusão, o material contém uma quantidade infinitesimal de cristais no fundente, que fica em equilíbrio termodinâmico com o líquido. Portanto, ambas as fases possuem a mesma energia livre de Gibbs. Desta maneira, a determinação da fase final do material, dependerá do processo de resfriamento [1].

Uma das primeiras teorias de formação, e também uma das mais simples, partiu do físico suíço Victor Moritz Goldschmidt que empiricamente dizia que os vidros possuíam como formadores, a fórmula genérica de R_nO_m , sendo geralmente, na forma de tetraedro com cátions cercados por quatro oxigênios [1, 29]. Em 1932, o físico norueguês William Houlder Zachariasen, que previamente havia trabalhado e sido co-autor de Goldschmidt, publicou o artigo intitulado *The Atomic Arrangement in Glass* (O Arranjo Atômico em Vidros - Em tradução livre), proclamando que as interpretações anteriores estavam inconsistentes [30] e se tornando uma das bases mais utilizadas para as teorias subsequentes. O trabalho publicado por Zachariasen é possivelmente um dos artigos mais frequentemente citados na literatura a respeito de vidro, atualmente com 4716 citações no *Google Scholar*.

Inicialmente Zachariasen notou que os vidros possuíam redes, constituídas de poliedros conectadas pelos quatro vértices, ainda, tais redes se estendiam em três dimensões de forma que o comportamento em qualquer direção é igual, portanto, isotrópico. Posteriormente, postulou quatro condições topológicas, para ocorrer a formação vítrea, sendo três regras essenciais para que a diferença de energia entre cristal e vidro seja mínima, e uma quarta regra que permite uma extensão tridimensional [1, 30].

As regras de Zachariasen são: 1) cada ânion pode ser ligado a apenas dois cátions; 2) o número de ânions vizinhos deve ser pequeno, em torno de 3 ou 4; 3) os poliedros só podem ser conectados pelos vértices; 4) e, por fim, cada poliedro precisa ter ao menos

três vértices compartilhados com outros poliedros [30, 31]. Tais regras, são válidas para óxido do tipo A_2O_3 , formando-se triângulos ao redor do átomo A, para AO_2 e A_2O_5 , com formação de tetraedros e para os óxidos AO_3 e A_2O_7 , com forma de octaedros [1].

Agentes fundentes, utilizados para facilitar a fusão dos materiais, podem ser adicionados na composição da rede vítrea, isto permite que algumas das ligações do tipo A–O–A sejam quebradas e substituídas pelo agente fundente, como é o caso dos vidros de silicato de soda-cal, que geram ligações do tipo Si–O–Ca e Si–O–Na [32]. Os átomos de oxigênios quando estão ligados a dois átomos iguais, são chamados de oxigênios ligados (BO do inglês *Bridging oxygen*), enquanto os oxigênios que não possuem mais de uma ligação, são denominados de oxigênios não ligados (NBO do inglês *Non-bridging oxygen*), que diminuem a coesão e a estabilidade da rede, e conseqüentemente diminuem as temperaturas de transição vítrea e a temperatura de fusão [32].

Qualquer material pode ser um formador de vidro, caso seja resfriado rápido o suficiente, de tal forma, que não haja tempo o suficiente para o rearranjo periódico das estruturas [1].

Os vidros possuem como constituinte principal o tetraedro $[SiO_4]^{4-}$ bloco fundamental para a conexão da rede vítrea [32]. Cada silício é ligado com 4 átomos de oxigênio, e cada oxigênio tem ligação com dois átomos de silício [1].

Um dos tipos de vidros mais utilizados, são os vidros chamados de vidro soda-cal (*soda-lime*). Estes vidros possuem em sua composição Na_2O (soda) e o CaO (cal) [1].

Em contraste aos grupos de tetraedro tridimensionais dos vidros de silicato, os vidros a base de borato possuem grupos trigonais planares de BO_3 [1]. Devido a estrutura bidimensional, uma rede "tridimensional" surge pela aproximação dos planos, que interagem por meio da força de van der Waals [1].

Ainda, quando adicionado modificadores na rede, a quebra das ligações de de B–O–B para a formação de NBOs não ocorrem com a mesma frequência que nos silicatos. Entretanto, uma formação de novos grupos de poliedro ocasionam no surgimento de grupos de BO_4 . Essa mudança dos grupos, podem rearranjar-se em estruturas tridimensionais, como anéis de BO_4^- , estruturas de diboratos e até mesmo de outras espécies como piro-

boratos [33].

Alguns vidros possuem a capacidade de interagir com sistemas biológicos podendo induzir diversos efeitos positivos. Vidros que possuem esta característica, são denominados de vidros bioativos, uma classe especial de materiais: os biomateriais [28].

1.2 Biomateriais

Desde os primórdios, a humanidade tem buscado formas de melhorar as chances de sobrevivência da espécie, utilizando os recursos disponíveis na natureza de maneira inovadora. Exemplo disso, é o uso de ferramentas feitas a partir de pedras, galhos e outros materiais de fácil acesso na natureza, além de técnicas mais avançadas, como o uso de suturas [13] e cirurgias [34]. Esta procura incessante do ser humano gerou inúmeros avanços sociais, tecnológicos e científicos [35].

A ideia de biomateriais foi introduzido na comunidade científica nos anos de 1960, e sua definição provém da Sociedade Americana de Biomateriais em conjunto com a Sociedade Europeia de Biomateriais. Quaisquer materiais que possuam propósito de interagir com sistemas biológicos objetivamente, seja para avaliar, tratar, aumentar ou repor qualquer tecido, órgão ou função fisiológica do corpo é considerado um biomaterial. Desta maneira, é essencial possuam algumas características inerentes para efetuarem suas devidas funções sem maiores danos subsequentes ao sistema que for inserido [36, 37].

A biocompatibilidade é uma das características essenciais para um biomaterial, que por sua definição é um material que deve apresentar resistência aos ataques biológicos do corpo, sem reações inflamatórias, efeitos carcinogênicos e alergênicos, e que simultaneamente não perca seu propósito [38].

Mas há outras características que também são de interesse para a aplicabilidade destes materiais, tais como, a biofuncionalidade, sendo as características físicas e químicas que permitem a efetuação do propósito do biomaterial e à esterilizabilidade, necessária para que o material possa ser esterilizado sem que haja alterações nas propriedades, portanto o biomaterial deve possuir resistência as técnicas de esterilização, que podem incluir o uso de radiação gama, auto-clavamento, gás oxi-etileno e altas temperaturas. Ainda, o

material deve possuir durabilidade estável durante o período de intenção de uso. É de extremo interesse ainda, que a produção do biomaterial seja efetiva em acessibilidade e custo [38].

Os primeiros biomateriais desenvolvidos, tinham como propósito apenas reparar e restaurar poucas funções corporais, sem que causasse toxicidade ao hospedeiro, e muitos destes eram de origem metálicas, como as ligas de titânio e cobalto-cromo [13, 39, 40].

Com o tempo, devido aos avanços científicos e tecnológicos, novos biomateriais surgiram com a capacidade de interagir no sistema inserido, podendo melhorar as respostas biológicas. Como exemplo, tem-se os xenoenxertos realizados com pele de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em pacientes com queimaduras, melhorando a resposta de cura da pele [41].

Na atualidade, existem diversos tipos de biomateriais, que podem ser de natureza metálica, polimérica, cerâmica, vítrea ou um compósito, fornecendo diversidade em propriedades mecânicas, térmicas e químicas, à depender da necessidade de uso. Muitos biomateriais continuam sendo estudados e desenvolvidos para diversas aplicações, como o uso em dispositivos médicos, próteses e na regeneração de tecidos. A cada ano, ocorre um aumento significativo no número de pesquisas sendo publicadas com o foco em biomateriais [42, 43].

1.2.1 Vidros Bioativos

Entre os diversos tipos biomateriais, os vidros bioativos possuem uma rica história e importância na modernidade. Sendo inclusive, o primeiro tipo de biomaterial feito pelo homem a obter sucesso na ligação do material com tecidos vivos [18].

Os vidros bioativos são biomateriais a base de óxidos. Foram originalmente desenvolvidos por Larry Hench, visando a restauração e reparação de defeitos e anormalidades ósseas. Possui grande aplicabilidade clínica, incluindo para tecidos moles, devido a facilidade de modificar as matrizes vítreas, utilizando diferentes elementos químicos para aperfeiçoar as propriedades desejadas.

Usualmente, uma das avaliações mais utilizadas para a avaliação da bioatividade *in*

vitro destes materiais, ocorre por meio da interação do material com fluidos biológicos simulados, onde é avaliado o crescimento superficial de camadas de apatitas. Sendo o principal mecanismo atuante na formação destas camadas, a dissolução dos íons da rede vítrea [18,20].

Hench propôs que o processo de nucleação e precipitação da fase de hidroxiapatitas (HAp) em vidros silicatos, quando imersos em fluido corporal simulado (SBF, do inglês *Simulated body fluid*), ocorreria por meio de cinco etapas [18],

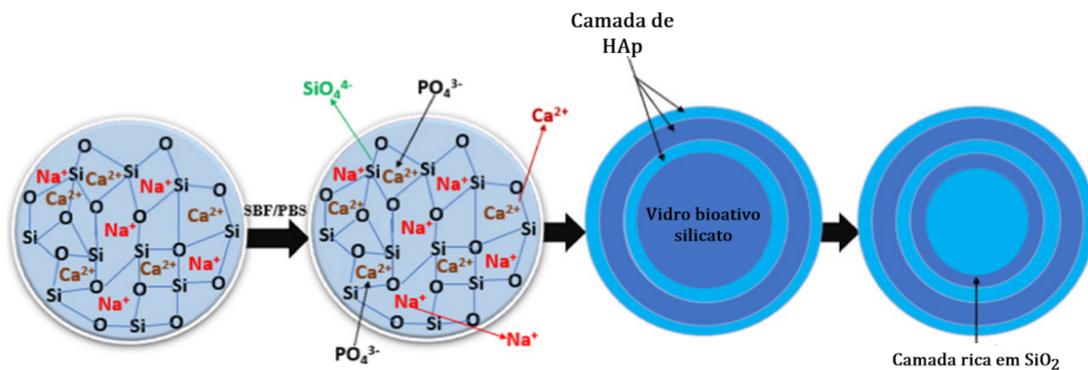


Figura 1.3: Processo de degradação do vidro bioativo de silicato e formação de camadas de hidroxicarbonato de apatita (HCA) após imersão em SBF. Adaptado de [2].

1. Uma troca de cátions do vidro, como Ca^{2+} e Na^+ , com íons de H^+ do fluido que ocasiona na formação de ligações de silanol ($\text{Si}-\text{OH}$) e no aumento do pH da solução;
2. Continuamente, a solução tende a se tornar alcalina, o que ocasiona na quebra das ligações de $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$, aumentando o conteúdo de silanol na interface entre o fluido e o vidro;
3. Grupos de hidroxila acabam reagindo e condensando, ocasionado na polimerização dos grupos de silanol, formando uma camada amorfa rica em sílica: a sílica gel;
4. A sílica gel é um camada propícia para a precipitação da HAp, assim, a difusão de cálcio do vidro (Ca^{2+}) e de fosfato (PO_4^{3-}) formam uma camada amorfa de fosfato de cálcio, o hidroxicarbonato de apatita (HCA), que eventualmente inicia o processo de cristalização;
5. Por fim, o último estágio leva a cristalização da HCA e a formação da camada de

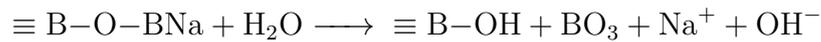
HAp.

Em geral, estes vidros, quando imersos em SBF, observa-se uma dissolução de Na^+ e Ca^{2+} , posteriormente, íons PO_4^{3-} do meio reagem com os íons de Ca^{2+} levando a nucleação e crescimento da camada de HCA. Alguns elementos que podem ser incorporados nas matrizes, possuem a capacidade de alterar os resultados. Como exemplo, quando o flúor está presente na matriz vítrea, a liberação de íons de F^- pode ocasionar formação de fluorapatita (FAp) [18, 44].

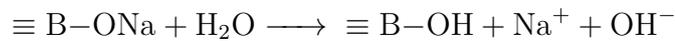
O mesmo mecanismo descrito acima, ocorre para a formação da camada de HCA e de HAp em vidros a base de borato, com exceção da formação das camadas de silanol. Os vidros de borato tem taxa de dissolução mais rápida que os silicatos, devido à sua baixa durabilidade química formam-se camadas de apatitas mais rápido [44, 45].

O processo para os vidros de borato pode ser resumido em quatro etapas:

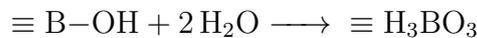
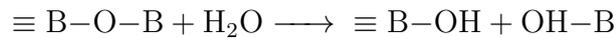
1. Inicialmente, a hidratação das ligações dos boros tetraédricos promove trocas iônicas, com liberação de íons alcalinos e alcalino-terrosos. Também induz a uma instabilidade estrutural, rearranjando as unidades de borato em estrutura triangular;



Quando o boro está presente em unidades tricoordenadas, a hidratação gera grupos de hidroxila:



2. A hidroxila ataca a estrutura do vidro promovendo a sua dissociação, resultando na formação de ácido bórico (H_3BO_3) e contribuindo para a variação do pH da solução;



O processo de hidratação e hidrólise ocorrem simultaneamente e continuamente, degradando o vidro com maior velocidade que os vidros silicato;

3. A migração dos grupos de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , provenientes das regiões internas do material, resultam em precipitação dos íons e de fosfato de cálcio na superfície do vidro;
4. A camada de fosfato de cálcio precipitada torna-se mais cristalina, podendo formar camadas de apatita, tal como a HAp, HCA ou a FAp.

Esse processo está esquematizado na Figura 1.4. Em geral, vidros bioativos de borato apresentam taxas de dissolução mais rápida e maior aumento de pH na solução em curto tempo, sendo considerados mais reativos que os vidros bioativos de silicato ou de borosilicato [2].

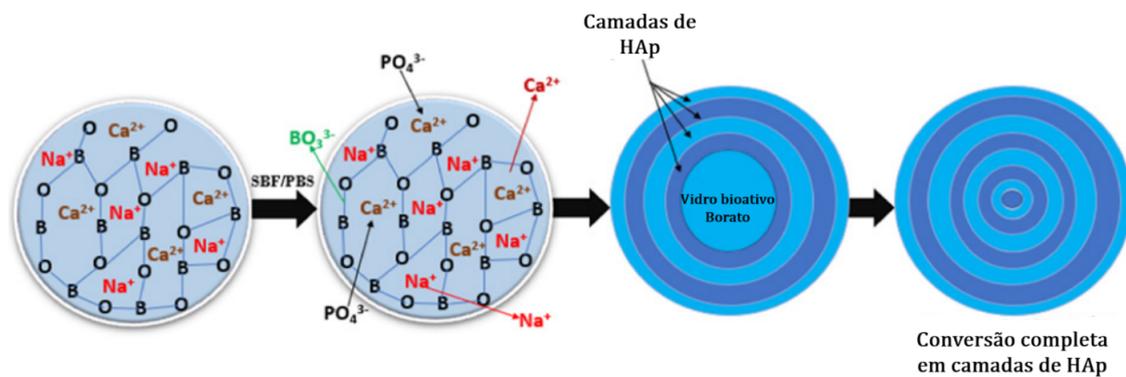


Figura 1.4: Processo de degradação do vidro bioativo de borato e formação de camadas de apatita após imersão em SBF. Adaptado de [2].

Ainda, existem diversos outros elementos químicos que podem ser utilizados para desenvolverem outros efeitos terapêuticos, a exemplo os íons de cobre podem auxiliar na aceleração da angiogênese e prata em propriedades anti-microbianas e anti-inflamatórias [18, 46].

O primeiro vidro bioativo: *Bioglass*® - 45S5

Em 1967, Larry Hench, em conversa com o Coronel Klinker do exército estadunidense, que acabava de retornar de uma campanha no Vietnã, foi desafiado com a seguinte pergunta: "Se você consegue fazer um material que sobrevive a exposição da alta energia da radiação, você consegue fazer um material que sobrevive a exposição ao corpo humano?". Tal indagação é o que levaria ao desenvolvimento do primeiro material vítreo

bioativo, o chamado *Bioglass*® (também denominado como 45S5 pela Universidade da Flórida), com o intuito de fazer uma ligação com o tecido ósseo sem ser rejeitado pelo corpo do paciente [19, 28].

Em 1968, Hench, submeteu uma proposta ao Comando de Desenvolvimento e Pesquisa da Companhia Médica do Exército Americano, o qual era baseado na seguinte hipótese: *"O corpo humano rejeita materiais metálicos e poliméricos sintéticos, ao formar tecido cicatricial, pois os tecidos vivos não são compostos de tais materiais. O osso contém um componente de fosfato de cálcio hidratado, a hidroxiapatita (HAp), e portanto, se um material conseguir formar uma camada de HAp in vivo pode ser que este não seja rejeitado pelo corpo"* [19].

Portanto, Hench desenvolveu uma matriz que possuía como base o silício, além do sódio, cálcio e fósforo ($45\text{SiO}_2 - 24,5\text{Na}_2\text{O} - 24,5\text{CaO} - 6\text{P}_2\text{O}_5$), o vidro bioativo 45S5 [19, 28].

O 45S5, ao ser implantado, possui uma degradação lenta e os produtos provenientes da dissolução do material, estimulam a produção das células osteoblásticas por meio da estimulação dos genes associados à diferenciação dos osteoblastos, isto é, o processo de osteoindução. Ainda, ao ser implantado o vidro consegue se integrar ao osso existente, melhorando a resposta do sistema para o crescimento de osso novo na superfície. Tais fenômenos são denominados de osteointegração e osteocondução [28].

A principal e mais prolífica aplicação dos vidros 45S5 é em usos ortopédicos e odontológicos [28]. Entretanto, há também estudos para aplicação deste vidro em tecidos moles, auxiliando no tratamento de feridas intestinais [47] e para regeneração de tecidos pulmonares [48, 49].

"Algodão doce que cura?": 13.93-B3

Apesar do sucesso do *Bioglass*®, os vidros bioativos a base de silicato possuem uma dissolução lenta, e acabam sendo ideais para partes do corpo onde o processo de restauração é a longo prazo. Por sua vez, os vidros bioativos à base de boro, tem dissolução mais rápida, pois possuem uma baixa resistência química, o que os torna mais propensos

a serem utilizados em regiões que precisam restaurar de maneira mais rápida [28].

Em 2010, a enfermeira Peggy Taylor tratou de um de seus pacientes diabéticos que possuía uma ferida na perna utilizando um pedaço de algodão. Poucos dias depois, a enfermeira viu que o processo de restauração da ferida estava em uma velocidade muito maior do que o esperado. Sem ela saber, mas o *algodão* em questão eram fibras de vidro bioativos processado com aparência muito similar ao algodão [23].

O vidro bioativo 13.93-B3, do sistema $56,6 \text{ B}_2\text{O}_3 - 4,6 \text{ MgO} - 18,5 \text{ CaO} - 11,2 \text{ K}_2\text{O} - 5,5 \text{ Na}_2\text{O} - 3,7 \text{ P}_2\text{O}_5$, comumente chamado de *Cotton Candy* (em tradução do inglês, algodão doce), é um vidro de base borato, desenvolvido por Steve Jung em conjunto com Delbert Day e Ted Day em torno de 2010, para ser um vidro bioreabsorvível, podendo ser utilizado em forma de fibras, replicando a microestrutura de coágulos de fibrina [23]. O 13.93-B3 foi observado como um agente de alta indução para a restauração de ferimentos, indicado para diabéticos, e está disponível para uso veterinário desde 2017 [20].

Na matriz do vidro 13.93-B3 há, intencionalmente, alta quantidade de cálcio, devido à sua importância para o processo de cura de ferimentos. De acordo com Jung, na época havia a hipótese de que a liberação local de íons Ca^{2+} atuava na migração das células da epiderme, além de participar de outros estágios mais avançados do processo de cicatrização [20, 23].

Vidro bioativo de borato 60B5F2P

O vidro bioativo do sistema vítreo cálcio-boro-sódio $60 \text{ B}_2\text{O}_3 - 5 \text{ CaF}_2 - 19 \text{ Na}_2\text{O} - 15 \text{ CaO} - 2 \text{ P}_2\text{O}_5$, chamado de 60B5F2P, foi desenvolvido em uma colaboração científica entre a Universidade Estadual de Maringá e a Universidade Federal do Maranhão, campus de Imperatriz com os professores Franciana Pedrochi e Alysson Steimacher, que gerou uma sequência de trabalhos de pós-graduação em nosso grupo de pesquisa [4, 50, 51].

Em 2018, houve a primeira tese de doutorado defendida com tema neste biomaterial, intitulada "Caracterização e Avaliação da Bioatividade *in vitro* do sistema vítreo: $60 \text{ B}_2\text{O}_3 - 5 \text{ CaF}_2 - (20-x)\text{Na}_2\text{O} - (15-x)\text{CaO} - 2x\text{P}_2\text{O}_5$ ($x = 0,1,2$)" de autoria de Pablo Nabuco Portes, do Programa de Pós Graduação em Física da Universidade Estadual de

Maringá [4]. Em sua tese, Nabuco estudou o sistema, em *bulk*, com adição de P_2O_5 , chamando as amostras BV0, BV2 e BV4, sendo sem adição, com 2(%) e 4(%), em massa, com de P_2O_5 , respectivamente, com o propósito de avaliar a bioatividade, *in vitro*, por meio de imersão em fluido corporal simulado. Os resultados mostraram que o vidro BV2, de composição idêntica ao 60B5F2P, apresentou os melhores resultados em bioatividade, em alguns ensaios equiparados ao 45S5.

Posteriormente, em 2021, Gibin em sua dissertação de mestrado, estudou a influência do tratamento térmico no 60B5F2P, avaliando a dinâmica de bioatividade também em SBF. Os resultados demonstraram que as fases cristalinas formadas nas vitrocerâmicas obtidas eram bioativas e não citotóxicas [51].

Em 2023, dos Santos estudou a vitrocerâmica obtida a partir do tratamento térmico do 60B5F2P à 715° em diferentes granulometrias para a produção de *scaffolds* mostrando que as fases cristalinas continuavam exibindo comportamento de bioatividade independente da granulometria [50].

Apesar de exibir perfil não citotóxico nos ensaios celulares com osteoblastos, a sua propriedade de alta dissolução não permitiu a aplicação como biomaterial osteointegrador, o que deu como motivo inicial o presente trabalho de estudo do vidro bioativo na forma de pó e em ensaios com células de fibroblastos, com o intuito de investigar a bioatividade e desempenho biológico para aplicações tópicas em pele.

Os fibroblastos modulam a matriz extracelular sintetizando e mantendo seus componentes, secretando citocinas e fatores de crescimento e respondendo a mudanças biomecânicas, que influenciam coletivamente os processos de regeneração, remodelação e reparo de tecidos conjuntivos [52].

A bioatividade dos vidros boratos, incluindo a formação de camada apatítica e a liberação controlada de íons, pode modular vias celulares que influenciam a atividade dos fibroblastos [53].

Estudos com fibroblastos funcionam como um modelo inicial para avaliação de biocompatibilidade e bioatividade. Embora os fibroblastos não formem diretamente a matriz óssea, eles estão envolvidos na formação do tecido conjuntivo do perióstio e endóstio,

contribuindo para um apoio à regeneração inicial, a secreção de colágeno e fatores de crescimento, que modulam o microambiente e recrutam osteoblastos e influenciam o processo inflamatório e de cicatrização, essencial para regeneração óssea [52, 54].

Já a pele, é altamente dependente de fibroblastos dérmicos para a produção da matriz extracelular (como o colágeno e a elastina), na reparação de feridas e reepitelização e na modulação de citocinas e fatores angiogênicos [52, 55].

Os vidros bioativos de boro possuem uma degradação mais rápida que os silicatos, liberando íons que podem estimular a proliferação, migração e secreção da matriz por fibroblastos, e já foram anteriormente testados com sucesso em curativos bioativos para queimaduras e feridas crônicas, para o estímulo de fibroblastos, com um aumento de migração e proliferação, acelerando o fechamento da ferida e na promoção da angiogênese via liberação de boro e outros íons [20, 21, 23].

1.3 O papel dos elementos químicos no processo de cicatrização

Existem diversos elementos químicos que são essenciais para a manutenção da vida humana no dia a dia. A grande parte dos elementos, tais como, o sódio, fósforo, cálcio, potássio, magnésio e entre outros, é absorvido pelo corpo por meio de ingestão de líquidos e alimentos [55, 56].

Os três vidros bioativos estudados neste trabalho: 60B5F2P, 45S5 e 13.93-B3, possuem diferentes elementos químicos em sua composição que atuam de diferentes maneiras e processos. Alguns destes elementos são: o Si, B e Ca provenientes dos reagentes óxidos utilizados na produção dos vidros. A liberação de íons durante o processo de dissolução dos vidros em meio simulado ou no próprio corpo, podem atuar modulando sinalizadores, vias e processos bioquímicos da fisiologia celular [21].

A quantidade de silício presente no organismo humano varia entre, aproximadamente, 140 a 700 g, dependendo das condições fisiológicas e anatômicas do indivíduo [56]. Para a manutenção de um estado adequado de saúde, estima-se que a ingestão diária recomen-

dada está entre 9 e 14 mg de silício [57].

Fibroblastos expostos a materiais a base de silício apresentam uma regulação positiva na expressão do fator de crescimento de fibroblastos (β -FGF), sugerindo um possível mecanismo de ação na promoção do reparo tecidual [58], e ainda, podendo atuar na proliferação celular [20]. Todavia, ainda não há um consenso de qual a importância da atuação silício nos mecanismos celulares [57].

O boro também tem papel vital para a vida, comumente encontrado na forma de ácido bórico no corpo humano [59], porém os compostos à base de boro possuem citotoxicidade com dose-dependência [59,60]. Alguns estudos indicam que o boro pode provocar infertilidade, problemas fetais e causar problemas de toxicidade. O boro aumentou a síntese de fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), e tem potencial de aumentar o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células fibroblásticas. O $\text{TNF}\alpha$ é uma citocina que regula processos de proliferação de fibroblastos, podendo atuar na angiogênese, assim como no processo inflamatório [15,55]. O VEGF é uma proteína que estimula a formação de vasos sanguíneos, angiogênese, sendo uma das etapas essenciais para o fechamento de feridas [15]. Estudos mostraram avaliações realizadas com íons dissolvido de vidros de borato atuando diretamente na proliferação celular [20,21]. Desta forma, quando bem dosado (0,5 g/ml e 10 g/ml), o boro pode ter um papel importante nos processos de cura de uma ferida [55].

O cálcio é outro elemento químico fundamental, atuando na regulação e controle de diversos processos bioquímicos e celulares [55]. Ele participa ativamente da produção de trombina, e níveis elevados de cálcio podem acelerar a formação de coágulos, promovendo a polimerização dos monômeros de fibrina [61].

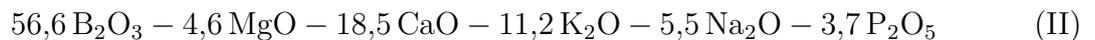
Além disso, o cálcio modula importantes processos celulares, como a proliferação e diferenciação celular, sendo essencial na maturação dos queratinócitos e na formação da barreira lipídica da epiderme [55]. Os íons de cálcio também aumentam a atividade metabólica dos fibroblastos, favorecem a ação das metaloproteinases (MMPs), estimulam a deposição de colágeno, influenciam a expressão de citocinas e otimizam a contração da ferida [55,62,63].

Materiais e Métodos

Este capítulo compreende a descrição dos protocolos experimentais para a preparação das amostras de vidros bioativos e das técnicas utilizadas para as caracterizações e avaliações realizadas com os materiais em pó neste trabalho.

2.1 Preparação dos vidros bioativos

Para este estudo três sistemas vítreos foram selecionados e manufaturados: 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5, as composições estão mostradas nas expressões I, II e III, respectivamente, em percentual de massa total.



O vidro 60B5F2P já foi estudado anteriormente em colaboração com a Universidade Federal do Maranhão, campus de Imperatriz, sendo tema de dissertações de mestrado e de teses de doutorado em nosso grupo de pesquisa [4, 50]. Os vidros 45S5 e 13.93-B3 são extensamente estudados na literatura científica, disponíveis para uso comercial médico e veterinário [19, 20].

Os três vidros escolhidos foram preparados por meio do método de fusão e resfriamento em duas etapas em um forno (Forno LF0091604, Fornos Jung Ltda, Blumenau BRA).

Os reagentes, da marca Sigma-Aldrich®, com grau de pureza entre 98% e 99,99%, utilizados para a preparação das amostras, estão descritos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Descrição dos reagentes em porcentagem de massa e mol utilizados para a preparação das amostras.

45S5			13.93-B3			60B5F2P		
Reagente	Massa (%)	mol (%)	Reagente	Massa (%)	mol (%)	Reagente	Massa (%)	mol (%)
SiO ₂	45	46,1	B ₂ O ₃	56,6	54,6	B ₂ O ₃	60	61,78
CaO	24,5	26,9	CaO	4,6	22,1	CaO	15	14,44
Na ₂ O	24,5	24,4	Na ₂ O	18,5	6	Na ₂ O	20	18,18
P ₂ O ₅	6	2,6	MgO	11,2	7,7	CaF ₂	5	4,59
-	-	-	K ₂ O	5,5	7,9	P ₂ O ₅	2	1,01
-	-	-	P ₂ O ₅	3,7	1,7	-	-	-

Os reagentes tiveram as suas massas aferidas em uma balança analítica (UW220D, Shimadzu, Quioto JPN), com precisão de 0,1 mg, seguindo o percentual de massa total descritos nas equações I, II e III.

Com exceção do P₂O₅ adicionou-se os reagentes a um cadinho de platina e foram submetidos ao processo de fusão, seguindo a rampa de aquecimento demonstrada na Figura 2.1. Com isso gerou a degaseificação de CO₂, dos reagentes CaCO₃ e Na₂CO₃ afim de obter os óxidos CaO e Na₂O, que devem serem aquecidos e mantidos por uma hora em 900 e 450°C, respectivamente. Após isso, os reagentes atingiram a temperatura de fusão, e foram mantidos por 120 minutos para obter uma mistura homogênea e totalmente líquida. É feito o vertido em um molde de aço inoxidável, previamente aquecido a 470°C em forno mufla (Forno Mufla 3000 10P Inox 220V, EDG Equipamentos e controles Ltda, São Carlos BRA), permitindo que o material sofresse um choque térmico.

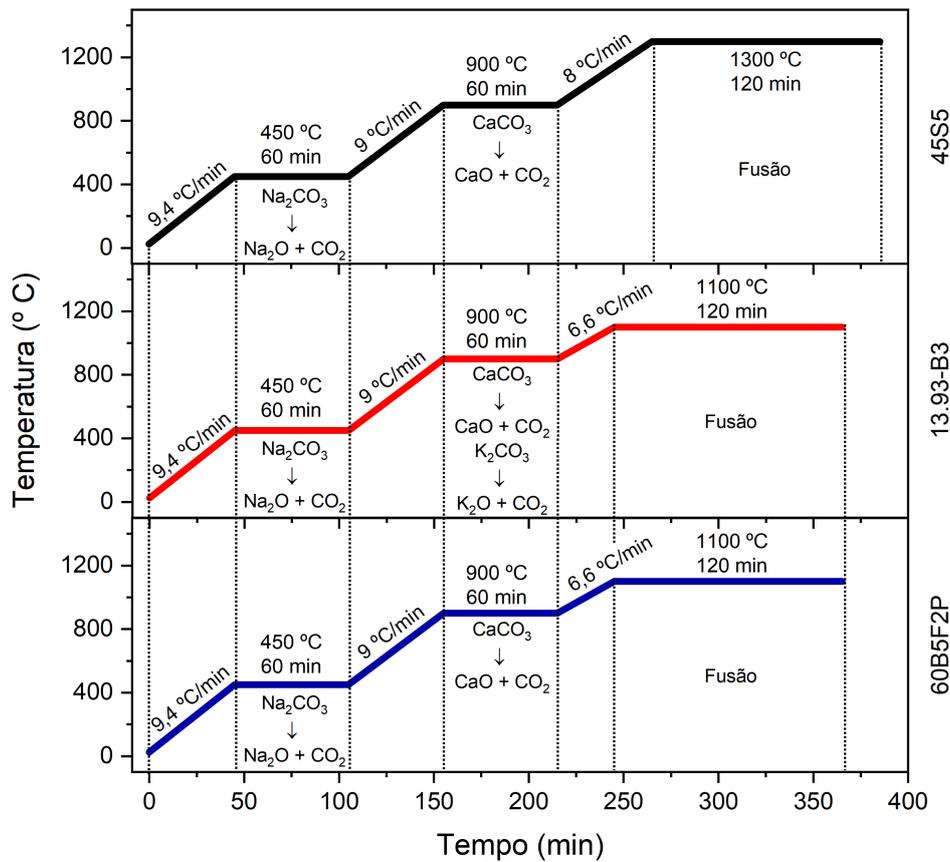


Figura 2.1: Rampas de aquecimento dos materiais para o processo de manufatura dos vidros bioativos.

O material fundido foi então transformado em pó e, em conjunto com o P_2O_5 , adicionado novamente ao cadinho de platina para ser aquecido até a temperatura de fusão (1100 °C para os vidros boratos e 1300 °C para o vidro silicato), por 20 minutos, até atingir o estado líquido. Posteriormente, o líquido foi vertido em um molde de aço, previamente aquecido a 470 °C, para o choque térmico. Os três vidros foram submetidos ao processo de trituração, sendo pulverizados manualmente em almofariz de ágata. A tamisação obtida para cada vidro foi realizada utilizando peneiras de nylon com tamanho de partícula entre 180 e 250 μm .

2.2 Parâmetros experimentais

2.2.1 Análise térmica

A análise térmica foi realizada utilizando um calorímetro (SDT Q600 v20.9, TA Instruments, New Castle USA), acoplado com o módulo de DSC-TGA, apoio técnico do Laboratório do Grupo de Vidros e Cerâmicas, em colaboração com o Professor João Carlos Silos Moraes da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de Ilha Solteira. As medidas foram realizadas em cadinho de platina com taxa de aquecimento de 10°C/min até uma temperatura de 1100°C em atmosfera de nitrogênio.

2.2.2 Análise de tamanho de partícula

Para a obtenção da distribuição de tamanho de partícula utilizou-se um analisador de tamanho partículas por difração de laser (Bettersizer S2-WD, Bettersize Instruments, Dandong CHN) com apoio técnico do Grupo de Estudos Multidisciplinares do Ambiente (GEMA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), equipado com uma fonte de excitação em 635 nm, e configurado com o método de espalhamento Mie. Os vidros em pó foram depositados em um porta amostra em suspensão com água destilada por dois minutos antes da análise. O resultado da medida é uma média de três varreduras.

2.2.3 Difractometria de raios X (DRX)

Difratogramas de raios X das três amostras, antes e pós imersão em SBF, foram obtidas por meio de um difratômetro de raios X (XDR-7000, Shimadzu, Quioto JPN), com o apoio técnico do Grupo de Desenvolvimento e Inovação em Dispositivos Multifuncionais (GDDM) da UEM, utilizando radiação $K\alpha$ -Cu, sobre tensão de 40,0 kV e 30,0 mA de corrente. As amostras em pó, foram dispostas em um porta amostra de vidro, e cada medida foi realizada em temperatura ambiente com passo de 0,7 °/min de 7° a 65°.

2.2.4 Espectroscopia Raman

Espectros Raman foram adquiridos por meio de um microscópio Raman Confocal (Senterra, Bruker Optik GmbH, Ettlingen DEU), denominado μ -Raman, disponível no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da UEM. As amostras foram submetidas à uma excitação de 532 nm com potência nominal de 20 mW, em grade de 1200 grooves/mm e lente de magnificação de 20x. Cada espectro é uma média de 30 varreduras obtidos com um tempo de integração de 20 segundos, resolução espectral de 3 a 5 cm^{-1} na região de 1800 a 300 cm^{-1} . Todos os espectros foram normalizados por meio do método do vetor normalização e submetidos à correção de linha de base.

2.2.5 Espectroscopia FTIR-ATR

Utilizou-se um espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Bruker Vertex 70v FTIR, Bruker Optik GmbH, Ettlingen DEU), acoplado a um acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR)(modelo Platinum Diamond ATR Unit A225, Bruker Optik GmbH, Ettlingen DEU) disponível no COMCAP da UEM para obter cada espectro das amostras em pó, antes e pós imersão em fluido corporal simulado, foi utilizado a seguinte configuração: resolução espectral de 4 cm^{-1} , intervalo espectral 4000 a 400 cm^{-1} e 128 varreduras, em temperatura ambiente. Todos os espectros foram normalizados utilizando o método do vetor normalização e submetidos a correção de linha de base.

2.3 Teste de bioatividade *in vitro*

Fluido Corporal Simulado (SBF) foi preparado seguindo o protocolo descrito por Kokubo e Takadama [3]. A Tabela 2.2 apresenta todos os reagentes utilizados, e as respectivas quantidades para a produção do SBF, que é preparado em 700 ml de água ultra pura (Direct-Q®3 UV, Merck Millipore, Burlington USA).

Tabela 2.2: Reagentes utilizados para a produção de Fluido Corporal Simulado [3].

Ordem	Reagente	Quantidade
1	NaCl	8,035 g
2	NaHCO ₃	0,355 g
3	KCl	0,225 g
4	K ₂ HPO ₄ 3 H ₂ O	0,231 g
5	MgCl ₂ 6 H ₂ O	0,311 g
6	1,0M-HCl	39 ml
7	CaCl ₂ 2 H ₂ O	0,387 g
8	Na ₂ SO ₄	0,072 g
9	Tris	6,118 g
10	1,0M-HCl	0-5 ml

Inicialmente, os 700 ml de água ultra pura foram depositados em um béquer de plástico, na presença de um agitador magnético e banho térmico (Banho maria TE-054 mag, Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba BRA) configurado a 36,5 °C e com precisão de 0,1 °C. Com o auxílio de um pHmetro (mPA210, MS Tecnopon Equipamentos Especiais, Piracicaba BRA) com precisão de $\pm 0,001$, devidamente calibrado, e de um termômetro comum, com precisão de $\pm 0,1$, os reagentes foram adicionados, na ordem descrita na Tabela 2.2. Na diluição dos reagentes tomou-se o cuidado para adicioná-los, somente após a diluição do último reagente adicionado e sempre mantendo a temperatura 36,5 °C. Por fim, completou-se com água ultra pura para se obter 1000 ml de solução e averiguou-se o pH em 7,42 a 36,5 °C.

Em seguida, após o resfriamento do fluido a temperatura ambiente, com um filtro (Merck Millipore) de 0,22 μm realizou-se a filtragem e armazenamento da solução em frasco plástico à uma temperatura entre 6 a 10 °C.

Para a realização do teste de bioatividade foram utilizados tubos de 15 ml de fundo cônico (tipo falcon), sendo cada tubo preenchido com 11 ml de solução SBF para 11 mg de amostra em pó (n=3). Após adicionar as amostras em pó ao fluido, manteve-se o

frasco em imersão em banho térmico a 36,5 °C. Para cada vidro foi utilizado 9 períodos de imersão: 1, 3, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas. Inicialmente, a cada 12 horas, cada frasco em imersão foi agitado gentilmente de forma manual a fim de aumentar o contato do pó com o fluido. Após o período de 48 horas a agitação ocorreu a cada 24 horas.

Após cada período, os tubos foram retirados do banho térmico e transferidos para uma centrífuga para a sedimentação do material restante, utilizando 3000 rotações por minuto, por um período de 5 minutos. Retirou-se o líquido sobrenadante e a amostra precipitada foi lavada com água ultra pura. Novamente, os frascos foram centrifugados a 3000 rotações por minuto, por 5 minutos, retirou-se o sobrenadante de água ultra pura e adicionou-se álcool isopropílico ao material precipitado. Por meio de uma pipeta aspirou o material que foi então secado em um estufa por 24 horas. O pH do SBF foi aferido antes e após a imersão dos vidros.

Por fim, após a secagem do material, aferiu-se a massa utilizando uma balança analítica (UW220D, Shimadzu, Quioto JPN) de precisão $\pm 0,1$ mg.

2.4 Ensaios biológicos *in vitro*

Os ensaios biológicos foram desenvolvidos em conjunto com o laboratório da professora Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali e a doutoranda Amanda Gratão Silvestrin, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UEM.

2.4.1 Cultivo celular

A linhagem L-929 de fibroblastos foram cedidas pelo professor João Carlos Palazzo de Mello, do Departamento de Farmácia da UEM. As células foram cultivadas em frascos de cultivo (25 cm²) contendo *High Glucose-Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco™- Thermo Fischer Scientific, USA), suplementado com penicilina-estreptomicina 1% (Pen-Strep, Sigma-Aldrich™, St. Louis USA) e soro fetal bovino a 20% (FBS, Gibco™- Thermo Fischer Scientific, USA). As garrafas foram mantidas em estufa para cultura de células em atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C e os experimentos foram execu-

tados após a verificação de confluência celular¹ de aproximadamente 80%.

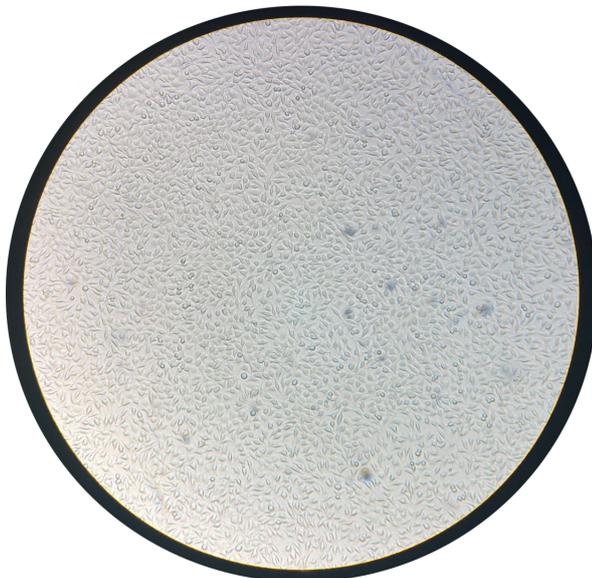


Figura 2.2: Monocamada de células L-929 aderidas em frasco de cultivo em confluência.

2.4.2 Avaliação da viabilidade Celular pelo método MTT

Os experimentos para estimativa da viabilidade celular foram realizados com quatro grupos, sendo três grupos de amostras de vidro bioativo (60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5) e um grupo controle de células sem tratamento, utilizando o método MTT-Formazan (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl formazan, Thiazolyl blue formazan, Sigma-Aldrich™, St. Louis USA). As células L-929 foram cultivadas em monocamada, em placas 96 poços, com concentração inicial de $2,4 \times 10^4$ células/poço e em meio completo suplementado com antibióticos. As placas foram incubadas em estufa de cultivo por 24 horas antes da realização do experimento.

Posteriormente, foram preparadas soluções dos vidros bioativos em suspensão no meio de cultura, com a concentração de 1000, 700, 400 e 100 $\mu\text{g/ml}$, que manteve-se em suspensão pelo período de uma hora, sob efeito de ultrassom a 37°C. Seguiu-se retirando o meio de cultura dos poços e substituindo com o novo meio, dividindo os poços em grupos: Controle, 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P, em concentrações crescentes de 100 a 1000 $\mu\text{g/ml}$.

¹Confluência celular é a porcentagem de área coberta pela aderência das células.

As placas foram novamente incubadas em estufa de cultivo por 1, 12 e 24 horas, seguindo de acordo com a esquematização apresentada na Figura 2.3.

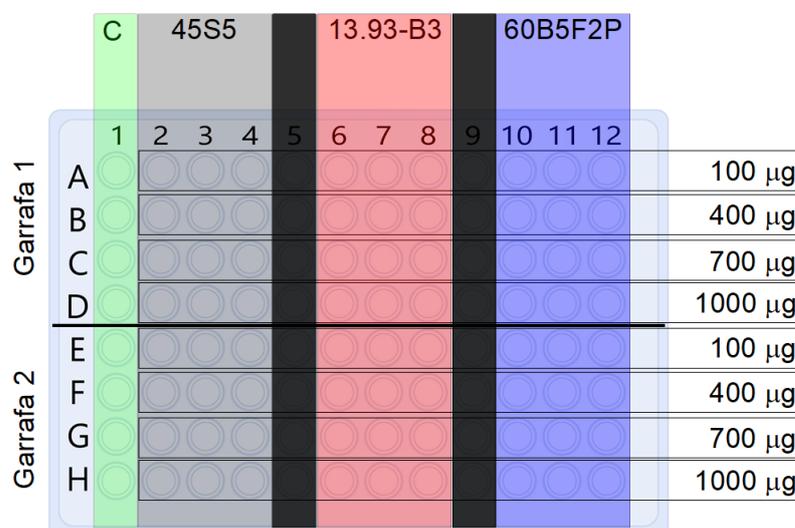


Figura 2.3: Esquema da placa de 96 poços para o teste de MTT. As regiões destacadas (colunas) em verde, cinza, vermelho e azul mostram as posições dos grupos controle, 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P, respectivamente, em concentrações de 100, 400, 700 e 1000 µg/ml (linhas). As colunas em preto são poços não utilizados.

Após o tratamento, as células foram incubadas por 2 horas, a 37°C em CO₂-5%, com MTT (5mg/ml, em tampão DPBS do inglês *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) para a incorporação do mesmo e conseqüente formação dos cristais de formazan pelas células metabolicamente ativas. Em seqüência, a solução de MTT foi retirada e substituída por DMSO (Dimetil Sulfóxido-100%, Sigma-Aldrich™, St. Louis USA), 100 µl/poço e incubada novamente por 15 minutos em estufa para a solubilização completa dos cristais de formazan.

Leituras de absorvância foram realizadas utilizando uma leitora de microplaca FlexStation 3 (FlexStation 3, Molecular Devices, LLC, San José USA), com comprimento de onda em 542 nm, disponível no COMCAP da UEM. O número de células viáveis foi estimado e expresso em porcentagem relativa ao controle.

2.4.3 Teste de ferida (*Scratch assay*)

O teste de ferida foi realizado para avaliação do efeito dos vidros bioativos 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5 na capacidade de migração e proliferação das células L-929, semeadas em placas de 96 poços, com concentração de $2,4 \times 10^4$ células/poço. Atingindo a confluência no poço, uma ferida foi realizada na monocamada aderida, utilizando a ponteira de uma pipeta de $10 \mu\text{l}$ em cada poço. A Figura 2.4 ilustra o procedimento experimental para o teste de ferida.

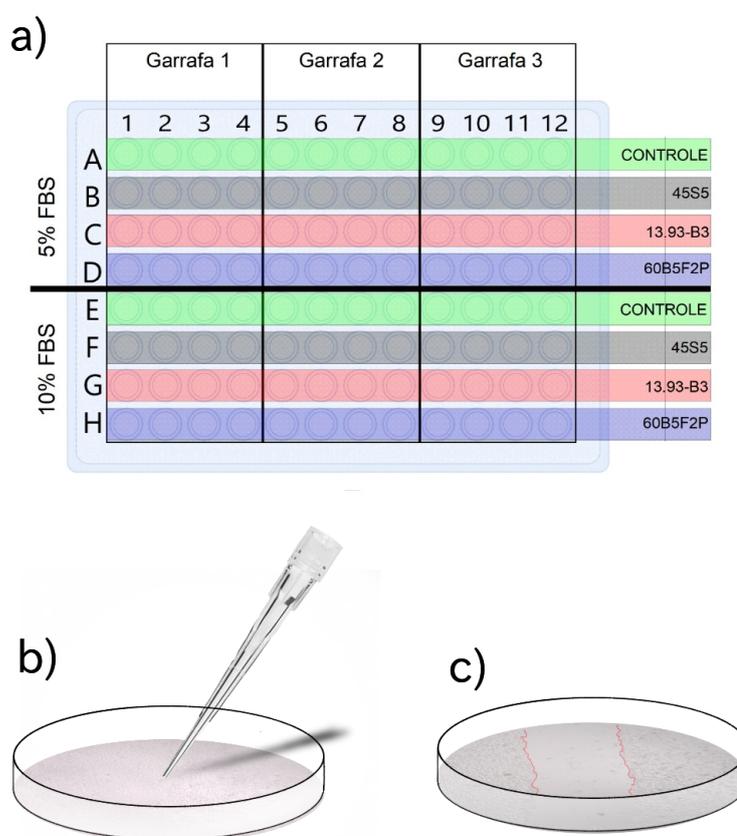


Figura 2.4: Em a) Esquema da placa de 96 poços para o teste de ferida. As regiões destacadas (linhas) em verde, cinza, vermelho e azul mostram as posições dos grupos controle, 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P, respectivamente, em concentrações de $100 \mu\text{g}$. Os poços de A até D são poços suplementados com meio pobre em FBS (5%) e os poços de E até H suplementados com meio rico em FBS (10%). b) Exemplo de poço com células aderidas e ponteira de $10 \mu\text{l}$ utilizada para realização da ferida. c) Poço com células aderidas e com a ranhura delimitada em vermelho para melhor visualização.

Após a realização das feridas nos poços, metade das células foram mantidas com o 10% de soro fetal bovino (FBS) no meio, e metade permaneceu em meio pobre de FBS (5%)

para reduzir a interferência da proliferação celular e afim de avaliar os efeitos proliferação e migração separados [64, 65]. Cada vidro bioativo foi adicionado nos meios de cultura padrão e pobre em FBS, obtendo a concentração de $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ por poço de cada amostra. Um grupo de células sem tratamento foi utilizado como controle para comparação da taxa de fechamento da ferida. As placas foram mantidas em incubadora, a 37°C em CO_2 -5%. As imagens foram coletadas a cada 24 horas utilizando um microscópio invertido (Primo, Carl Zeiss, Oberkochen DEU) até o período de 72 horas, posteriormente as imagens de 0 horas e 76 horas foram avaliadas utilizando o software Image J para a determinação da área em branco (sem células), para calcular a área percentual usando a variação da área determinada em relação ao tempo [64, 65]. A Figura 2.5 é um exemplo de uma área de ferida delimitada para determinação de área sem células.

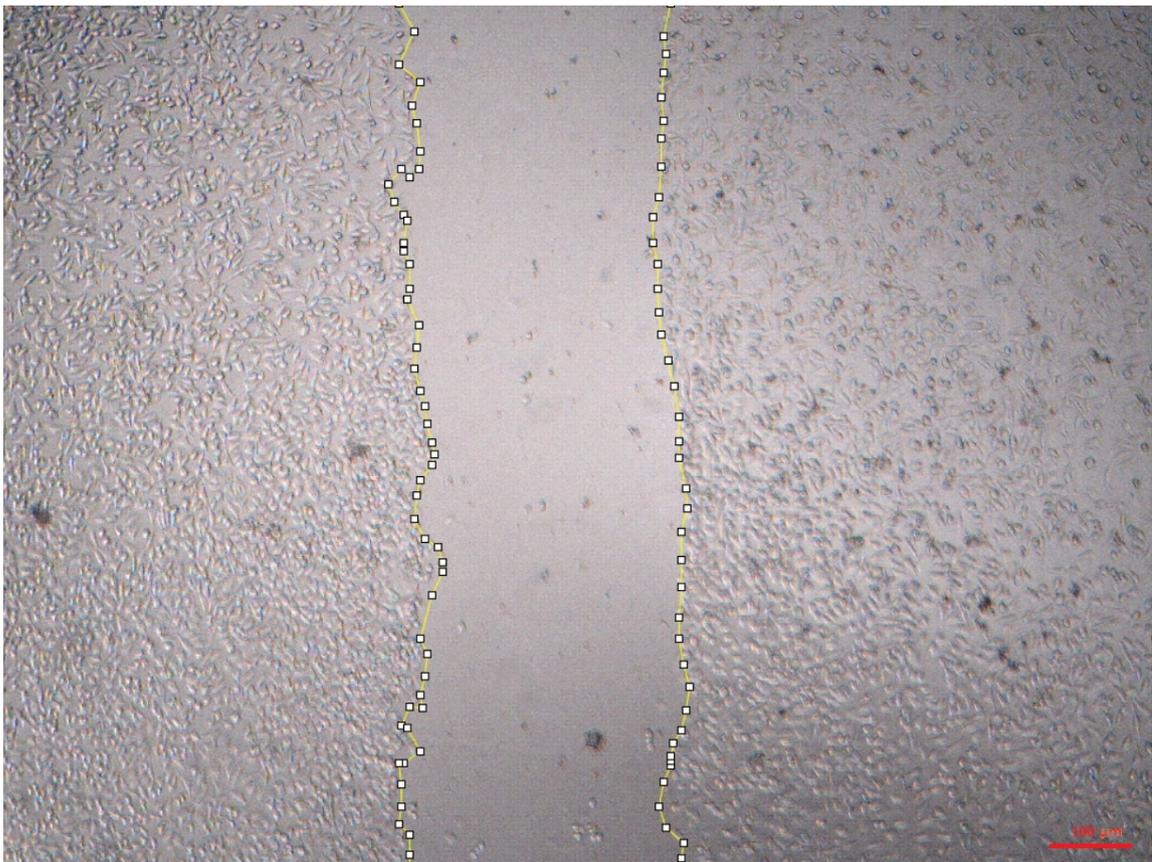


Figura 2.5: Exemplo de determinação de área de uma ferida em uma monocamada de células aderidas. No canto inferior direito, em vermelho, a barra de escala de $100 \mu\text{m}$.

2.4.4 Testes estatísticos

Os resultados obtidos nos ensaios biológicos *in vitro* de MTT foram analisados estatisticamente, utilizando teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para as amostras com distribuição normal, utilizou o teste para amostras paramétricas, ANOVA de um fator e utilizou-se o post hoc de Bonferroni. Em caso de distribuição não normal, foi empregado o teste não paramétrico, Teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado para ambos os testes foi de 95% ($p < 0,05$).

Para o teste da ferida, foi utilizado o teste estatístico ANOVA de dois fatores, utilizando-se o post hoc de Bonferroni e adotou-se o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

R

Resultados e Discussão

3.1 Caracterização dos Materiais

A caracterização dos biomateriais foram efetuadas nos vidros em pó, afim de avaliar as características físicas e os grupos funcionais químicos de interesse (borato, silicato e fosfato) e serão apresentadas as análises nas seções a seguir.

3.1.1 Tamanho de Partícula

Os três vidros foram tamisados conforme descritos em Materiais e Métodos (capítulo 2, seção 2.1), e submetidos as análises para verificar e padronizar o tamanho de partícula a ser utilizado nos experimentos, a fim de se diminuir fenômenos que poderiam estar relacionados as diferenças de tamanho. A distribuição do tamanho de partículas para cada vidro está na Figura 3.1.

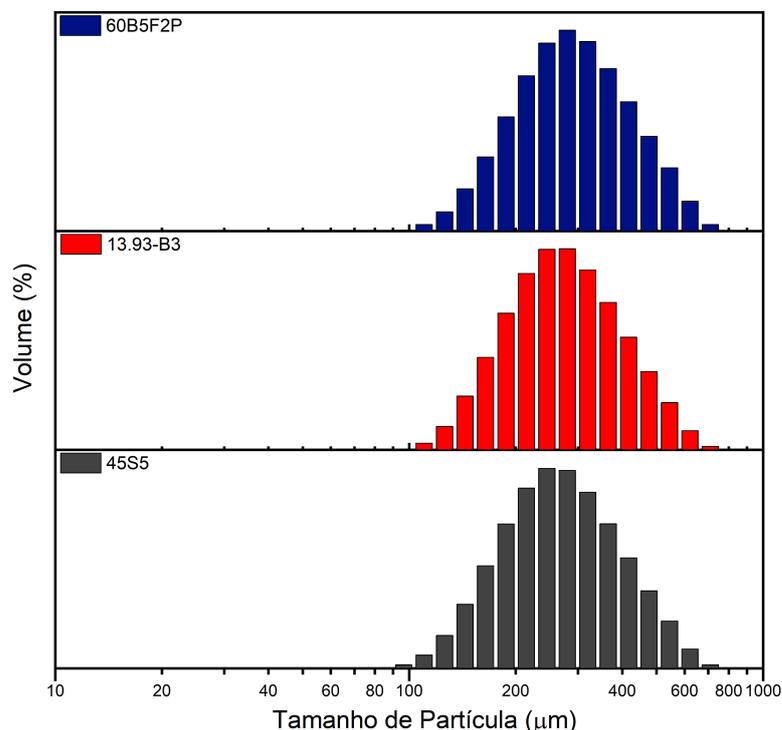


Figura 3.1: Distribuição de tamanho de partícula para as amostras de vidro bioativos: 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5, após o peneiramento em peneira de faixas de *mesh* de 180 a 250 μm .

Os resultados obtidos demonstraram uma distribuição de tamanho para as três amostras em pó, se concentrando na faixa de 85 μm a 710 μm . O D50, também chamado de tamanho médio das partículas, foi de 282,8, 284,13 e 306,53 μm para os pós dos vidros bioativos de 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P respectivamente.

O processo de pulverização dos vidros, realizado manualmente com choques mecânicos, ocasionou em partículas com diferenças morfológicas, desta forma partículas com tamanho maiores a granulometria das peneiras utilizadas as atravessaram resultando na distribuição da Figura 3.1. Além disso, a presença de partículas de tamanhos menores, pode ser atribuído devido as forças de interações eletrostáticas.

3.1.2 Difratomia de raios X

Os difratogramas obtidos por meio da técnica de DRX realizada nos vidros 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5 estão expostos na Figura 3.2. É possível observar halos, formas caracte-

rísticas de materiais amorfos, o que determina a natureza desordenada da estrutura dos vidros, podendo se averiguar que durante o processo de manufatura dos materiais não foram formadas fases cristalinas.

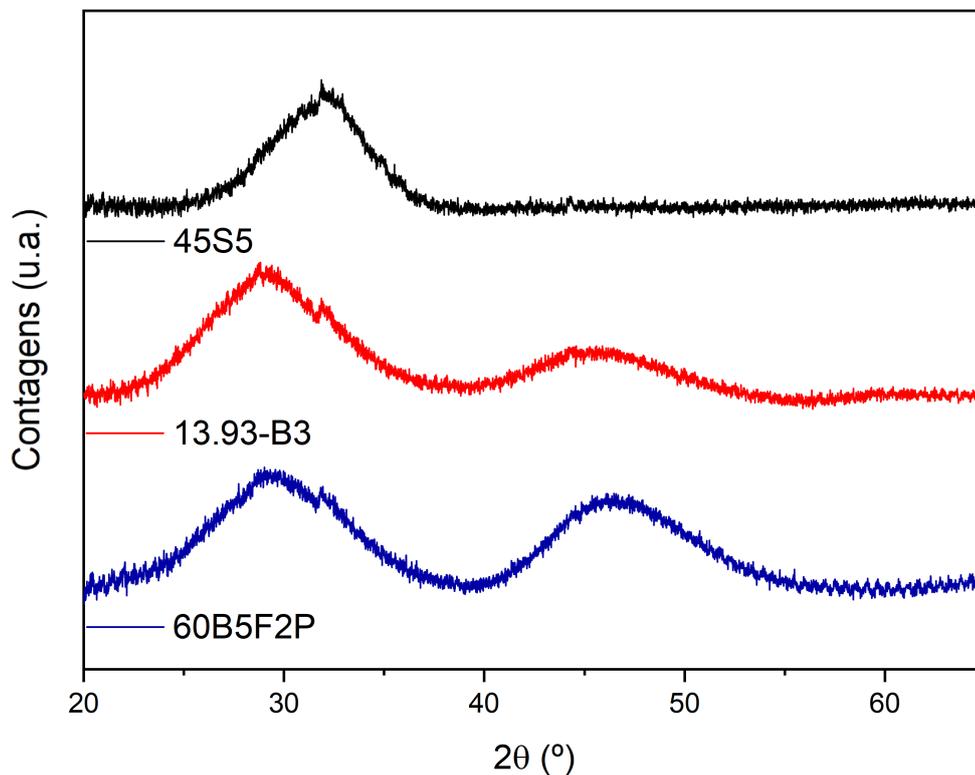


Figura 3.2: Difratoogramas de raios X dos vidros 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P.

3.1.3 Análise Térmica

A caracterização térmica dos materiais permite a avaliação de diferentes regiões de temperatura no qual podem ocorrer mudanças estruturais nos materiais. Foram determinadas as temperaturas específicas: transição vítrea (T_G), início de cristalização (T_X), pico de cristalização (T_C) e início de fusão ou decomposição de fases cristalinas (T_M). Quando acima da temperatura de cristalização, os vidros se encontram em estado líquido com alta viscosidade [1].

Na Figura 3.3 é apresentado o comportamento térmico dos vidros estudados, 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P, obtidos por meio da técnica de DSC. A Tabela 3.1 mostra as tem-

peraturas características para cada amostra.

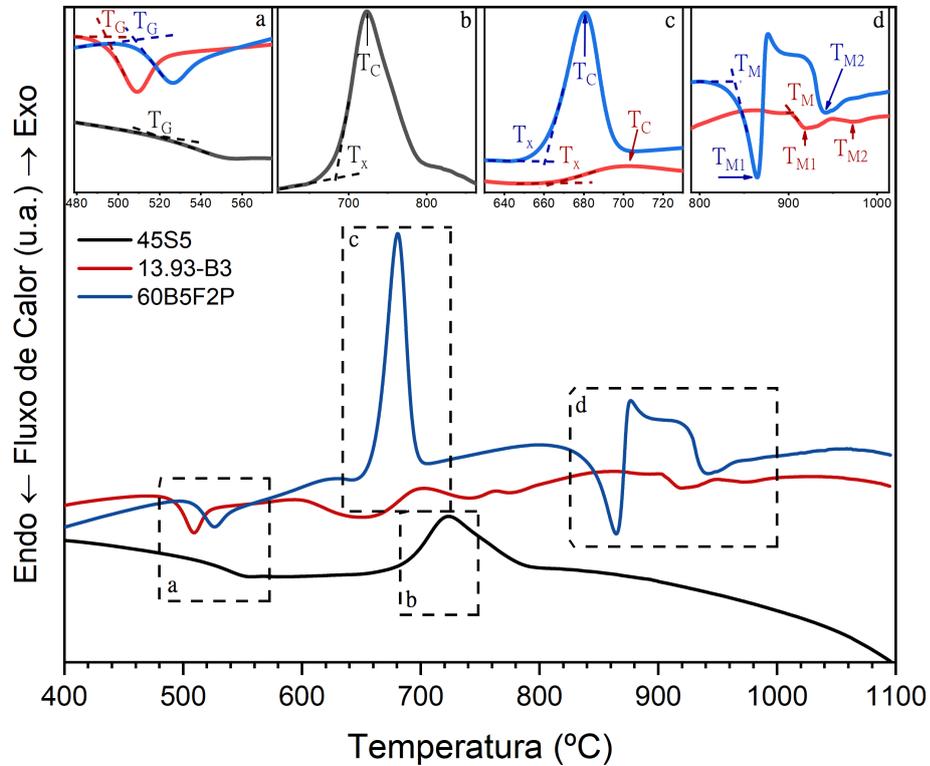


Figura 3.3: Termogramas obtidos para os vidros bioativos 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P, com taxa de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio. As regiões pontilhadas destacam as temperaturas características dos vidros. Os detalhes mostram **a**) a região de T_G , **b**) e **c**) as regiões de T_X e os picos de T_C e **d**) a região de T_M . A intersecção das retas determinam as temperaturas de início das mudanças estruturais.

Tabela 3.1: Caracterização térmica dos vidros bioativos estudados, em pó, obtido a partir do termograma das análises de DSC.

Amostra	T_G (± 5 °C)	T_X (± 5 °C)	T_C (± 5 °C)	T_M (± 5 °C)	T_{M1} (± 5 °C)	T_{M2} (± 5 °C)	ΔT (± 10 °C)
45S5	517	689	725	-	-	-	172
13.93-B3	493	665	701	903	919	973	172
60B5F2P	507	661	680	842	865	941	154

O vidro a base de silicato possui todas as temperaturas características mais altas que os de borato, ocasionado pela estabilidade da rede tetraédrica de SiO_4 [66]. A temperatura

de fusão do vidro 45S5 não foi observada no termograma, devido à temperatura máxima da medida ter sido realizada até 1100°C, sendo menor que a temperatura de fusão. A temperatura de fusão do 45S5 ocorre na região entre 1070 a 1278 °C, com dois picos endotérmicos, T_{M1} e T_{M2} em 1192°C e 1255°C, respectivamente, sendo associadas as decomposições de fases cristalinas [5, 67].

A diferença na temperatura entre os vidros boratos ocorre pela presença dos óxidos modificadores no vidro 13.93-B3, tal como o MgO e K₂O, que podem aumentar a energia necessária para as mudanças estruturais [68]. Também é observado, que há duas regiões de picos endotérmicos para os vidros boratos, em temperatura superior ao T_M , as temperaturas de pico T_{M1} e T_{M2} .

As temperaturas características obtidas para os vidros bioativos 45S5 e 13.93-B3 estão de acordo com as avaliações disponíveis na literatura [5, 67–69], assim como para o 60B5F2P que também demonstrou resultados compatíveis com os trabalhos já realizados anteriormente [4, 50].

A estabilidade térmica (ΔT), é correspondente à resistência que o material tem para a formação de fases cristalinas e para o processo de nucleação foi calculada para os três vidros bioativos utilizando os valores obtidos por meio dos termogramas. Em geral, os vidros que possuem uma estabilidade térmica acima de 100°C, podem ser tratados termicamente antes do início das fases cristalinas [70].

3.1.4 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi empregada para obter informações dos modos vibracionais dos grupos químicos com o objetivo de caracterizar os vidros bioativos 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5 pré-imersão em SBF.

Os espectros Raman obtidos para cada vidro estão mostrados na Figura 3.4, e na Tabela 3.2 são apresentadas as principais atribuições químicas.

Observa-se que vidro 45S5 possui uma banda centrada em 625 cm⁻¹, designada para os grupos de Si–O–Si, que comumente ocorre em sistemas vítreos Na₂O – CaO – SiO₂ [6]. A bem definida banda, centrada em 946 cm⁻¹, ocorre por vibrações de estiramentos

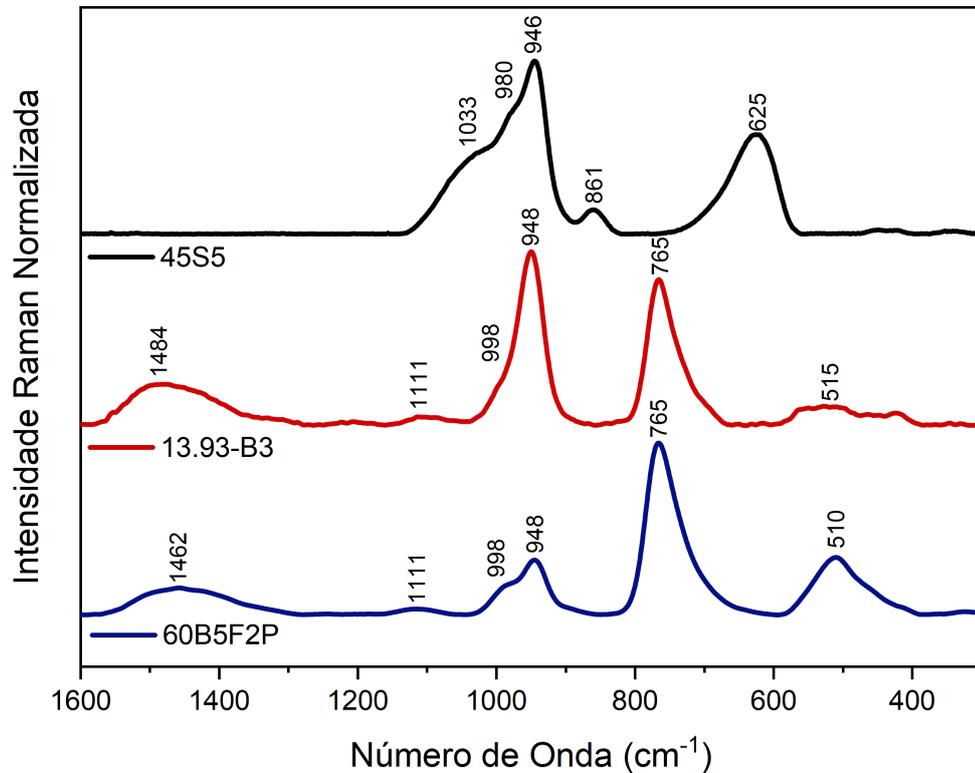


Figura 3.4: Espectros Raman normalizados das amostras vítreas: 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P.

simétrica dos grupo fosfato (PO_4), sendo o mais intenso pico do espectro [5]. Em 861, 980 e 1033 cm^{-1} , há contribuição de bandas associadas a ligações com pontes de oxigênios não ligantes (NBOs) sendo, SiO_4^{4-} , $\text{Si}_2\text{O}_6^{4-}$ e $\text{Si}_2\text{O}_5^{2-}$ com 4, 2 e 1 NBOs, respectivamente [5]. As duas últimas bandas com NBO mencionadas estão sobrepostas, e por isso não são bem definidas no espectro.

Nota-se que os espectros dos dois vidros de borato são semelhantes. Estudos sobre a organização estrutural destes vidros demonstram que há a possibilidade de coexistência de grupos de BO_3 e BO_4 , unidades trigonais e tetragonais, respectivamente, na formação de superestruturas [71].

Nos vidros borato, em 510, 515, 765 e 948 cm^{-1} ocorrem bandas de pentaboratos. Estas bandas estão associadas à quantidade de óxidos de fósforo modificadores presentes nos vidros [7]. O ombro em 998 cm^{-1} pode ser atribuído às unidades de PO_4 tetraédrico ligados por compartilhamento de átomos de oxigênios [8]. Em 1111 cm^{-1} observa-se uma

região relacionada aos grupos de diborato e por fim, em 1484 e 1462 cm^{-1} ocorre a banda do grupo das cadeias e anéis de metaboratos [7].

Tabela 3.2: Atribuição química das principais bandas de espectroscopia Raman presentes nos espectros dos vidros 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5 [4–8].

45S5		13.93-B3		60B5F2P	
Centro das bandas (cm^{-1})	Atribuição química	Centro das bandas (cm^{-1})	Atribuição química	Centro das bandas (cm^{-1})	Atribuição química
		1484	Metaborato	1462	Metaborato
		1111	Diborato	1111	Diborato
1033	$\text{Si}_2\text{O}_5^{2-}$	998	Polifosfato	998	Polifosfato
980	$\text{Si}_2\text{O}_6^{4-}$				
		948	Pentaborato, B–O–P	946	Pentaborato, B–O–P
946	PO_4				
861	SiO_4^{4-}				
		765	Pentaborato	765	Pentaborato
625	Si–O–Si				
		515	Pentaborato	510	Pentaborato

3.1.5 Espectroscopia FTIR-ATR

A espectroscopia FTIR-ATR, em conjunto com a espectroscopia Raman, se tornam uma vantajosa combinação para a caracterização de biomateriais. Por exemplo, a espectroscopia FTIR é mais sensível à detecção de moléculas polares, enquanto a Raman é menos dependente da polaridade molecular.

A Figura 3.5 mostra os espectros de FTIR-ATR dos vidros 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5.

A amostra de vidro 45S5 apresentou em seu espectro cinco bandas já reportadas anteriormente na literatura. As bandas apresentadas em 497 e 1012 cm^{-1} , são provenientes de ligações do silicato, sendo elas respectivamente, flexão e estiramento de Si–O–Si [5]. A banda em 918 cm^{-1} é relacionada a ligações com pontes de oxigênios não ligantes, Si–O–NBO, na rede do vidro [5, 10]. Em 592 cm^{-1} observamos, uma banda de fosfato amorfo, enquanto a banda de 738 cm^{-1} ocorre por conta de ligações de P–O–P [5].

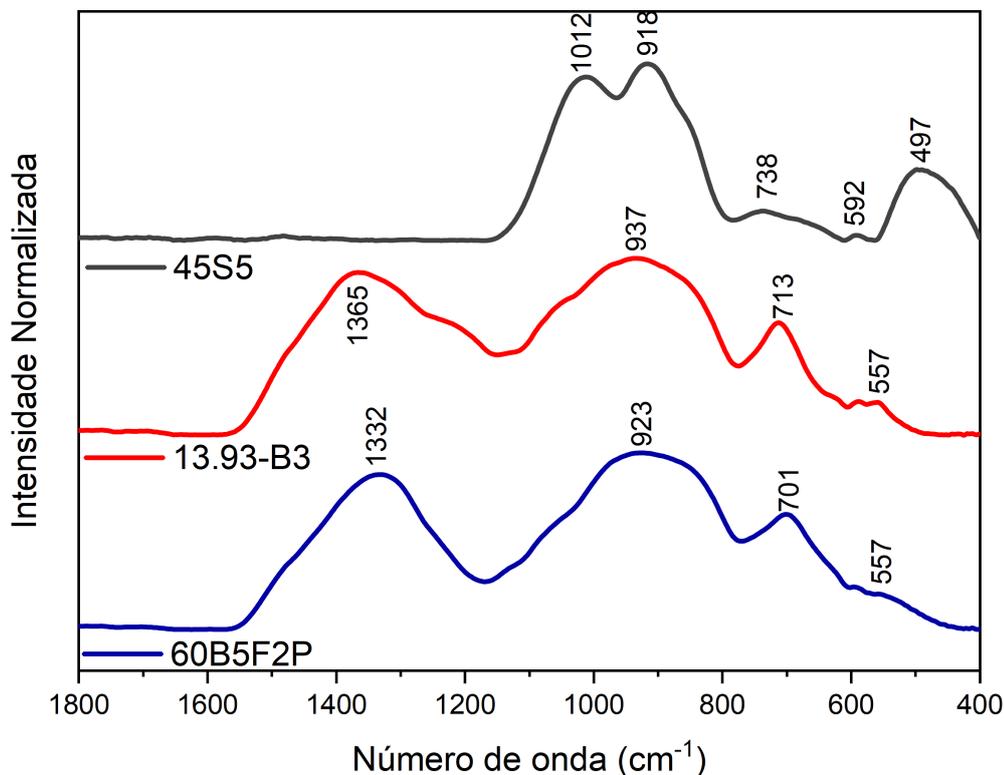


Figura 3.5: Espectros FTIR-ATR normalizados dos vidros bioativos: 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P.

Os vidros boratos possuem espectros similares. A banda centrada em 557 cm^{-1} é característica de grupos fosfatos, PO_4 [9]. Em 701 e 713 cm^{-1} observa-se as bandas provenientes de dobramentos de unidades de BO_3 [9, 11, 12]. Nas bandas centradas em 923 e 937 cm^{-1} têm-se os estiramentos de B-O de BO_4 [9, 11, 12]. Por fim, as bandas em 1332 e 1365 cm^{-1} de estiramentos das ligações de B-O, pertencentes aos grupos trigonais de BO_3 se faz presente [9, 11, 12]. Estas bandas estão sumarizadas na Tabela 3.3.

3.2 Pós-Imersão

Após a realização do processo de imersão em SBF, por períodos variando de 1 a 336 horas (14 dias), foram realizadas as análises do meio de imersão e dos vidros bioativos.

Tabela 3.3: Atribuição química das principais bandas de FTIR-ATR presentes nos espectros dos vidros 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5 [4, 5, 9–12]

45S5		13.93-B3		60B5F2P	
Centro das bandas (cm^{-1})	Atribuição química	Centro das bandas (cm^{-1})	Atribuição química	Centro das bandas (cm^{-1})	Atribuição química
497	Si–O–Si				
592	PO ₄	557	PO ₄	557	PO ₄
		713	BO ₃	701	BO ₃
738	P–O–P				
918	Si–O–NBO				
		937	BO ₄	923	BO ₄
1012	Si–O–Si				
		1365	BO ₃	1332	BO ₃

3.2.1 Análise de pH e perda de massa

O processo de bioatividade, originalmente proposto por Hench para vidros bioativos de silicato [19], pode ser entendido como uma forma de corrosão do vidro, que envolve interações complexas entre o material e os fluidos de imersão. O aumento do pH está associado à dissolução de íons presentes na superfície do material.

Durante o processo de imersão das amostras é esperado que ocorram alterações nos biomateriais devido à biodegradação e a formação de camadas apatitas. Portanto, após cada período o pH do meio de imersão foi avaliado, a 37,0°C, e a massa de todos vidros bioativos foi aferida na balança semi-analítica. A Figura 3.6 apresenta os valores de pH e a perda de massa comparando a massa antes e após, em percentual, em função do tempo de imersão.

Quando em imersão espera-se que o biomaterial comece a reagir com o meio, ocasionando em trocas iônicas entre eles. Quando há bioatividade no material é esperada sua degradação, e sua substituição por uma camada superficial de fosfato de cálcio. A liberação de íons acaba ocasionando em alterações no pH e gerando uma variação na massa das amostras durante o tempo de imersão.

Como é possível observar na Figura 3.6 (A), as três amostras em pó, apresentaram comportamentos semelhantes de pH ao longo do tempo, aumentando para valores próximos a 8,0 no período final de imersão. Nos períodos menores que um dia de imersão ocorre variação de pH mais abrupta, como mostra o detalhe na Figura 3.6 (A), após este

período o pH segue aumentando, porém de forma mais gradativa, tendendo à saturação ao final das 336 horas (14 dias) de imersão.

Vidros boratos tem uma vasta quantidade de unidades trigonais BO_3 e tetraédricas BO_4 ligadas durante a formação da estrutura de rede vítrea, enquanto os cátions modificadores, tais como Na^+ , K^+ e Mg^{2+} , estabilizam a carga líquida por meio de pontes de oxigênio. Nestes vidros, o processo de lixiviação começa com a dissolução de íons Na^+ e Ca^{2+} da superfície do vidro para a solução, enquanto a rede B-O do vidro é afetada pela solução de fosfato, aumentando os níveis de cátions e OH^- . O H^+ criado durante a hidrólise da água rompe a estrutura da rede do vidro, produzindo B(OH)_3 ou B(OH)_4 solúveis em água.

Após a rede de borato na superfície do vidro ser rompida, os íons PO_4^{3-} no meio de dissolução reagem com íons Ca^{2+} na superfície do vidro, provocando a nucleação de fosfato de cálcio. Posteriormente, o fosfato de cálcio criado pode ser permeado por íons PO_4^{3-} adicionais através de seus canais, reagindo com os sítios Ca^{2+} abaixo dele para gerar uma camada adicional de fosfato de cálcio. Este processo contínuo de dissolução-precipitação pode produzir inúmeras camadas de fosfato de cálcio que reduzem a interação vidro-solução até que o vidro de borato agregado seja transformado em fosfato de cálcio, em sua forma mais cristalina: a hidroxiapatita [2].

A Figura 3.6 (B) mostra a perda de massa das amostras, comparando pré com pós-imersão em SBF. É possível observar que todos os vidros bioativos perderam massa durante as 336 horas de imersão em SBF. Sendo o comportamento dos vidros boratos semelhantes.

Para o vidro 60B5F2P, a perda de massa percentual chegou a atingir cerca de 90% entre os períodos de 168 a 336 horas, e para o 13.93-B3 69% em 168 horas (7 dias) e 83% em 336 horas (14 dias). Isto indica que o vidro 60B5F2P possui uma dinâmica mais acelerada, com maiores alterações ocorrendo a partir de 96 horas e tendendo a se estabilizar já em 168 horas de imersão, enquanto para o vidro 13.93-B3 a dinâmica continuou evoluindo de maneira progressiva durante as 336 horas de experimento.

As mudanças observadas nos vidros boratos, sugerem que a dissolução do boro e dos

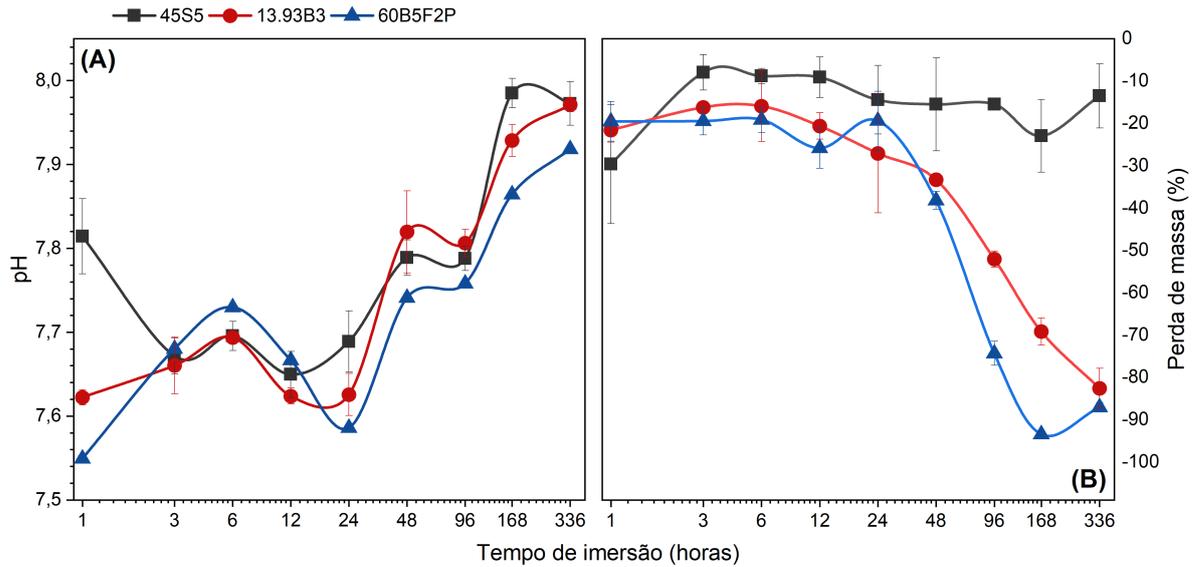


Figura 3.6: Comportamento dos vidros 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P em função do tempo de imersão ($n = 3$): (A) variação de pH da solução de imersão e (B) perda de massa percentual dos vidros. As linhas são guias visuais. No tempo igual a zero (pré-imersão) o pH do SBF é igual a 7,4.

íons modificadores, tais como sódio, cálcio, flúor, magnésio e potássio, e em conjunto com os íons de fosfato no fluido acabam por se organizarem em camadas de fosfato de cálcio [22, 72, 73], fornecendo as mudanças descritas para o pH e a massa. Sendo que possivelmente, o vidro 60B5F2P possui menor durabilidade entre as três amostras, portanto tem a tendência de maior dissolução em contato com o SBF [22].

Sabe-se que o processo de degradação do vidro 45S5 inicia-se com uma liberação seletiva de íons que ocasiona em um aumento de pH. Existem evidências que nos tempos iniciais, o *Bioglass®* possui uma maior liberação de íons de cálcio que vidros boratos [9, 74], o que poderia indicar uma alteração mais abrupta de pH no período de uma hora. Da mesma maneira, nesse mesmo período, uma maior perda da massa, comparada aos vidros borato, que pode ter sido ocasionado pela dissociação de partículas de tamanhos menores, já discutidas anteriormente no tópico 3.1.1, indicando uma degradação inicial do material. Posteriormente, o pH continua tendo um aumento progressivo, mas não são visíveis alterações significativas na massa, um possível indicativo da repolimerização da rede de silicato [28].

3.2.2 Espectroscopia Raman

Após o procedimento de imersão das amostras em SBF, os três vidros apresentaram uma dinâmica de alterações espectrais dentro das 336 horas de experimento, como é possível observar por meio da Figura 3.7.

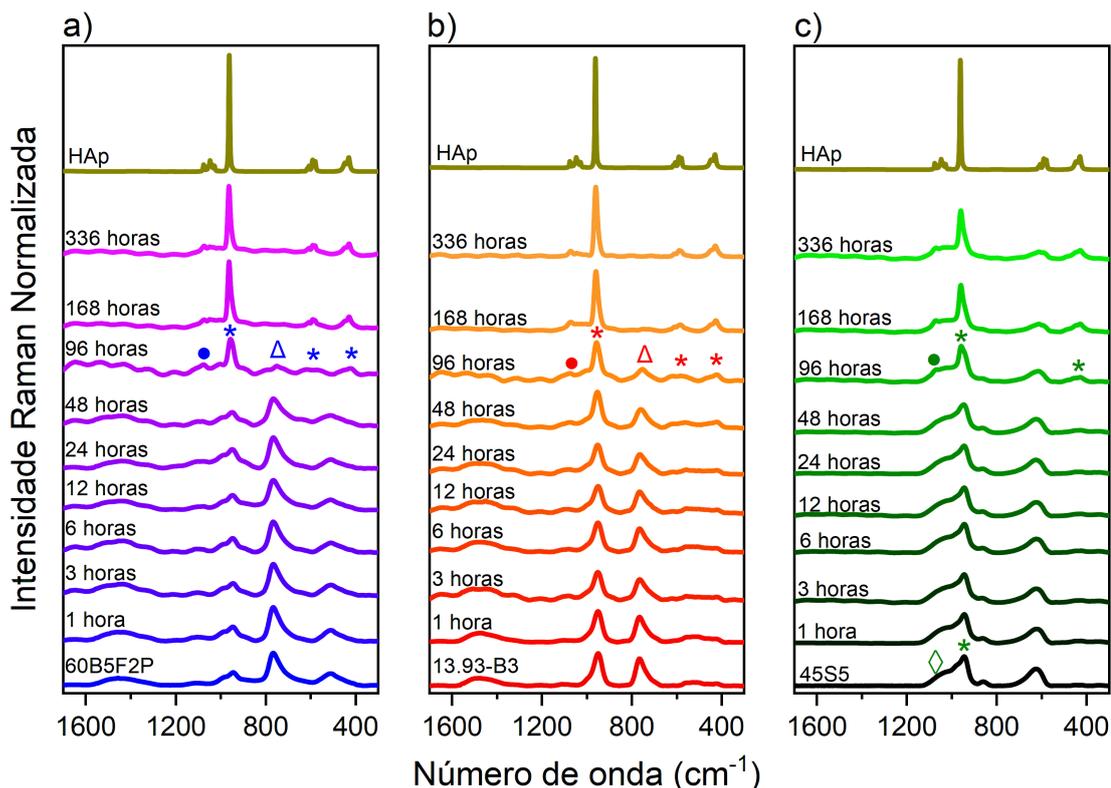


Figura 3.7: Espectros Raman normalizados dos vidros bioativos em diferentes períodos de imersão em SBF comparados com o espectro da hidroxiapatita (HAp). Em a) 60B5F2P, b) 13.93-B3 e c) 45S5. Os símbolos *, Δ , \diamond e \bullet indicam as alterações nas bandas de fosfato (PO_4^{3-}), borato (BO_3 e BO_4), silicato (SiO) e carbonato (CO_3^{2-}), respectivamente.

Nas primeiras 24 horas, os três biomateriais não apresentaram alterações espectrais significativas quando em imersão em SBF. Todavia, no período de 48 horas, nas amostras à base de borato, é possível observar que a banda centrada em 946 cm^{-1} , situa-se agora em 949 cm^{-1} no vidro 60B5F2P e de 948 em 952 cm^{-1} para o 13.93-B3. Nesta região do espectro, ocorre sobreposição bandas de B-O-P do borato e de PO_4 do fosfato, que fica mais evidente com a dissolução do boro. A banda de PO_4 desloca-se para 961 cm^{-1} posteriormente, tornando-se a banda mais intensa do espectro, e pode-se relacionar esse

deslocamento com a cristalização do fosfato de cálcio formado, possivelmente tornando-se uma apatita.

Também observa-se o surgimento de bandas em 1071, 586 e em 428 cm^{-1} para os três vidros bioativos, entretanto, para o 45S5 essas bandas são menos definidas, podendo ser um indício que o fosfato de cálcio formado estar menos cristalino.

As quatro bandas mencionadas estão presentes em espectros de apatitas, tal como a hidroxiapatita, com atribuições para unidades de fosfato, sendo $\nu_2\text{PO}_4$, $\nu_4\text{PO}_4$, $\nu_1\text{PO}_4$ e CO_3^{2-} para as bandas presentes em 428, 586, 961 e 1071 cm^{-1} , respectivamente.

As alterações que ocorrem no espectro apresentam uma dinâmica mais intensa para os vidros de borato, com as bandas de borato desaparecendo em função do tempo de imersão, demonstrando que, praticamente, todo o vidro foi convertido em fosfato de cálcio. Como discutido na seção de Análise de pH e perda de massa, os vidros borato perdem muito mais massa que o silicato, o que pode se correlacionar com uma maior eficiência na conversão do vidro bioativo de borato em fosfato de cálcio.

A dinâmica de bioatividade observada para o vidro bioativo 60B5F2P em pó é diferente do que já foi observado em trabalhos anteriores quando imerso em peça, onde já a partir de 1 hora já era possível observar características de apatita nos espectros Raman [4], enquanto para este trabalho foi observado de forma mais evidente a partir de 96 horas.

Esta diferença pode ser atribuída a fatores experimentais, como menor volume de amostra e diferenças metodológicas nos experimentos, sendo necessário a utilização de diversos processos (centrifugação, filtragem e secagem em estufa) para a avaliação das amostras em pó pós-imersão.

3.2.3 Espectroscopia FTIR-ATR

A Figura 3.8 apresenta os espectros de FTIR-ATR obtidos para as amostras em todos os períodos de imersão, na qual é possível observar uma dinâmica de alterações estruturais dos vidros.

Os vidros 13.93-B3 e 60B5F2P se comportam de maneira similar no tempo, quando em contato com o SBF. Já no período de uma hora, são observadas bandas pouco proemi-

mentos atribuídas à unidades de fosfato em 1026 e 602 cm^{-1} , que se tornam mais evidentes com o tempo devido à atenuação das contribuições das bandas de borato.

As bandas de fosfato se intensificam em conjunto com o aumento da cristalinidade, nos períodos de tempo maiores, atingindo as maiores variações em períodos acima de 24 horas, ainda, a contribuição das bandas de borato, presentes nas regiões de 700, 937 e 1350 cm^{-1} , diminuem indicando a dissolução do boro na solução, concomitante ao aumento da cristalinidade do fosfato de cálcio.

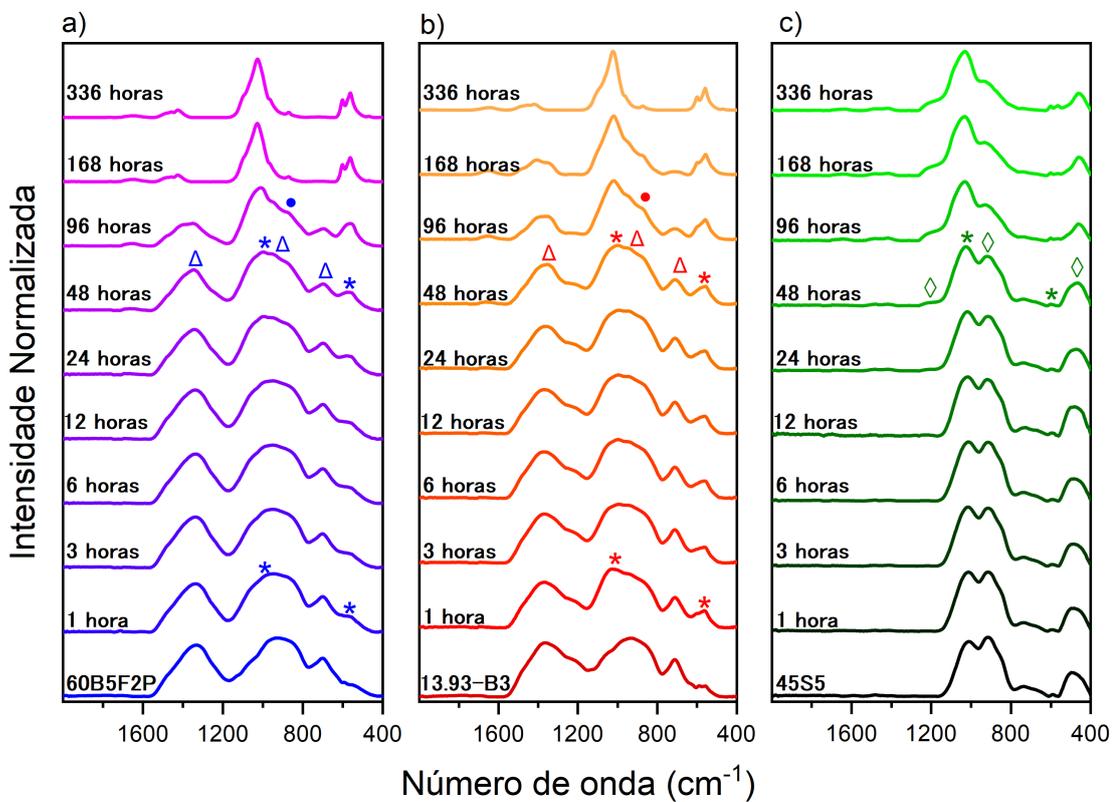


Figura 3.8: Espectros de FTIR-ATR normalizados dos vidros bioativos: a) 60B5F2P, b) 13.93-B3 e c) 45S5 em diferentes períodos de imersão em SBF. Os símbolos *, Δ , \diamond e \bullet indicam as alterações nas bandas de fosfato (PO_4^{3-}), borato (BO_3 e BO_4), silicato (SiO) e carbonato (CO_3^{2-}), respectivamente

Em 168 horas de imersão as maiores alterações espectrais foram observadas. As bandas de BO_3 e BO_4 já não são mais identificáveis no espectro e as bandas localizadas nas proximidades de 565 e 602 cm^{-1} , atribuídas aos modos vibracionais ν_4 triplamente degenerado da deformação angular de O-P-O presentes nos íons de fosfato (PO_4^{3-}) [75], podendo

estar correlacionado a formação da hidroxiapatita carbonatada, e a definição destas bandas é comumente correlacionada ao grau de cristalinidade da hidroxiapatita carbonatada formada [76]. A detecção apenas como um ombro no espectro, pode indicar a presença de uma hidroxiapatita carbonatada com baixa cristalinidade, ou ainda a existência de uma fase amorfa precursora de sua formação, como o fosfato de cálcio amorfo [75, 76], como observado para períodos de tempos menores que 168 horas.

A presença da banda em 870 cm^{-1} , evidente a partir de 96 horas, pode ser atribuída ao carbonato, do modo de vibração ν_2 de dobramentos de ligações de C-O em íons de CO_3^{2-} , fortalecendo a possibilidade da formação da hidroxiapatita carbonatada.

Por fim, nas amostras de 45S5 observa-se no período de 24 horas que há uma alteração na intensidade relativa da banda de 927 cm^{-1} em comparação à banda de 1020 cm^{-1} , indicando trocas iônicas e hidrólise da rede de sílica [9]. As demais bandas de silicato também se atenuaram nos períodos de imersão. Em 48 horas, a banda em 1200 cm^{-1} torna-se visível, indicando a polimerização de grupos de silanol [9]. No final das 336 horas de imersão, ainda é possível ver características espectrais do 45S5, além do fosfato de cálcio carbonatado formado, entretanto não tão cristalino como nos boratos, indicando que há uma dinâmica mais lenta.

A seção de Análise de pH e perda de massa mostrou que os vidros boratos apresentaram uma perda de massa muito superior ao vidro de silicato, para períodos acima de 24 horas, onde as maiores variações espectrais para os vidros boratos foram observadas por meio da técnica de espectroscopia FTIR-ATR, assim como na Espectroscopia Raman. A dinâmica observada nos espectros mostrou que a formação de fosfato de cálcio carbonatado ocorre com maior velocidade para os vidros de borato.

3.2.4 Difratometria de raios X

A Figura 3.9 apresenta os difratogramas das amostras de vidro bioativo em todos os períodos de imersão estudados.

Para as três amostras as maiores alterações observadas nos difratogramas ocorrem a partir de 48 horas de imersão, tempo no qual nota-se uma redução nos halos dos vidros

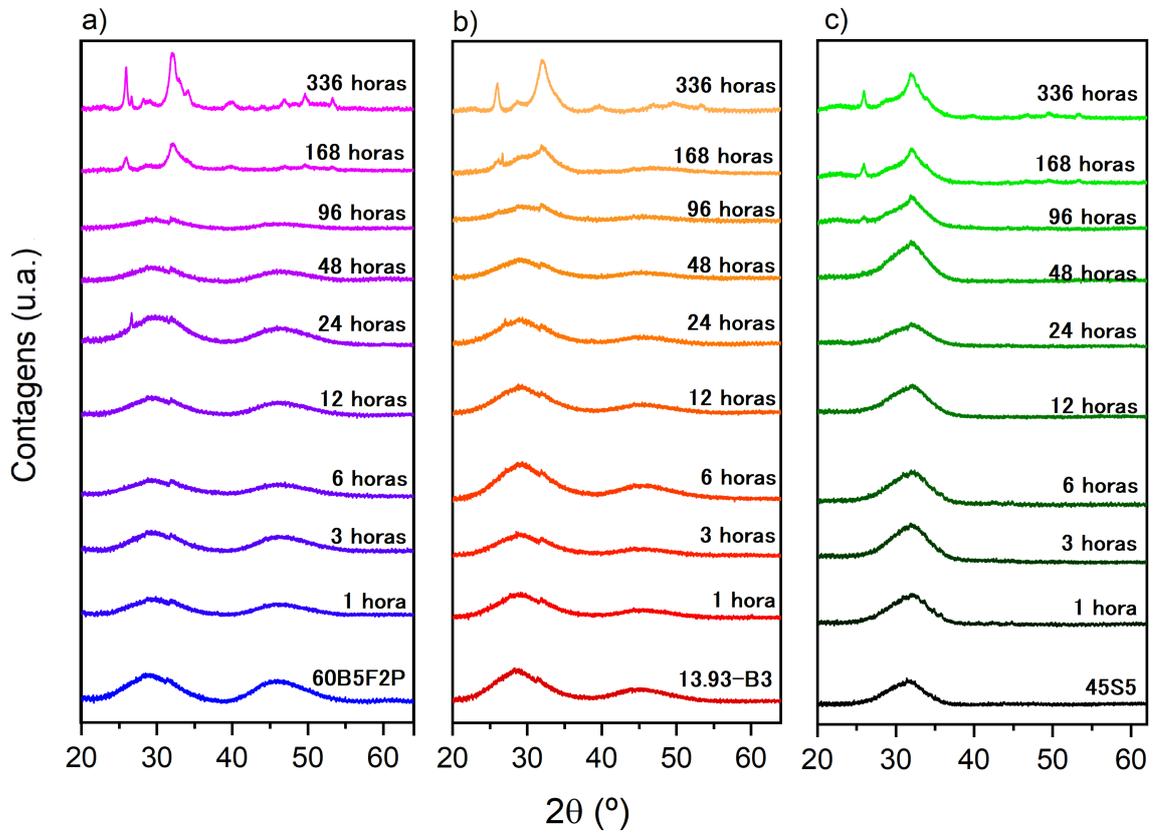


Figura 3.9: Difratomogramas dos vidros bioativos: a) 60B5F2P, b) 13.93-B3 e c) 45S5 para diferentes tempos de imersão em SBF.

bioativos de borato, principalmente em $2\theta = 46^\circ$. Em 168 horas (7 dias) para os três vidros, há o aparecimento de picos, sendo os mais evidentes em aproximadamente 26° e 32° , sendo no vidro 60B5F2P mais definidos, provenientes do fosfato de cálcio formado. Em 336 horas (14 dias) os picos se definem ainda mais nos boratos comparados ao silicato, com destaque para o 60B5F2P. Picos mais largos e pouco intensos podem sugerir que o fosfato de cálcio formado apresente baixa cristalinidade, cristais em escala nanométrica ou ainda uma combinação desses dois fatores [77].

A Figura 3.10 apresenta as três amostras ao final das 336 horas (14 dias) em imersão em SBF. Comparando com o difratograma da hidroxiapatita (JCPDS 09-0432), o 60B5F2P apresenta os mesmos picos da Hap presentes no 45S5, porém com características mais cristalinas, com destaque para o pico em $31,7^\circ$ (211).

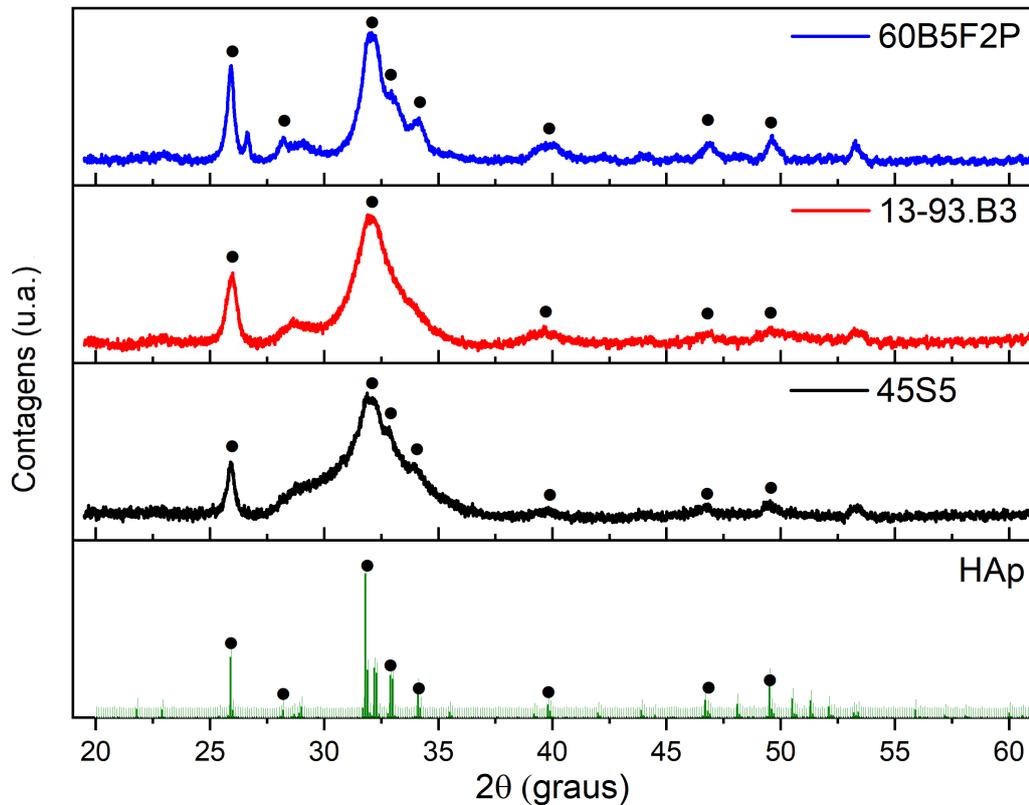


Figura 3.10: Difratoograma das amostras 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5 em 336 horas de imersão em SBF, comparados a hidroxiapatita (HAp). Os símbolos representam os picos mais intensos da HAp (JCPDS 09-0432).

O comportamento obtido para os difratogramas dos três vidros em função do tempo de imersão, estão em acordo com os resultados obtidos pelas espectroscopias Raman e FTIR que também mostraram que ao final dos 336 horas há a formação do fosfato de cálcio, sendo para a amostra 60B5F2P com maior cristalização.

3.3 Avaliações biológicas *in vitro*

Os testes *in vitro* foram realizados para avaliar possíveis efeitos biológicos dos vidros bioativos em meio de células fibroblásticas.

3.3.1 Avaliação de Viabilidade Celular por MTT

A Figura 3.11 mostra os resultados obtidos da avaliação de viabilidade celular para os vidros bioativos 60B5F2P, 13.93-B3 e 45S5. Os testes foram realizados com quatro concentrações: 100, 400, 700 e 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de vidro bioativo, incubados durante 1, 12 e 24 horas. Os valores representam a média de três experimentos, realizados em triplicata, utilizando duas garrafas, sendo cada garrafa considerado indivíduos independentes com um total de $n=6$. O resultado é uma média expressa em porcentagem relativa ao grupos controle (sem tratamento). Foram realizados testes estatísticos comparando os vidros bioativos ao grupo controle, considerando $p < 0,05$ significativamente diferente.

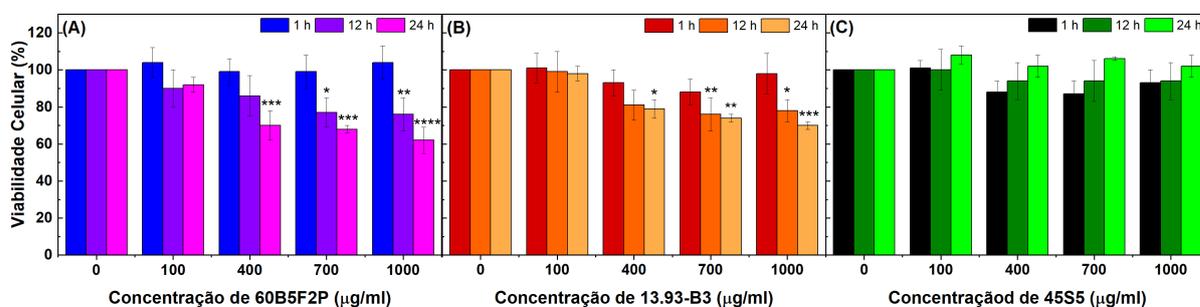


Figura 3.11: Viabilidade celular nas concentrações de 100, 400, 700 e 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dos vidros bioativos: (A) 60B5F2P, (B) 13.93-B3 e (C) 45S5 com incubações em 1, 12 e 24 horas. Os valores representam a média de um total de $n=6$ e estes dados estão expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) da porcentagem relativa, adotando-se o controle como 100% da viabilidade. Os símbolos *, **, *** e **** denota diferença com significância de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente, do grupo de amostra *versus* grupo controle, obtido por meio do teste estatístico de ANOVA 1 fator e teste de Krusal-Wallis.

O vidro bioativo 45S5 demonstrou excelentes resultados no teste de viabilidade celular, não apresentando nenhuma diferença significativa quando comparadas ao grupo controle, o que demonstra que o 45S5 pode ter sido incorporado a cultura celular de fibroblastos sem ocasionar perda na viabilidade das células [21]. Na literatura é discutido que o 45S5 possui uma boa biocompatibilidade com as células fibroblásticas L-929, e ainda, podem estimular a liberação de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [49, 78, 79]. Todavia, este resultado não é uma implicação de melhora da viabilidade celular, pois o 45S5 apresentou baixas taxas de dissolução no período de 24 horas, sendo difícil de avaliar os efeitos da cultura celular no curto período de 24 horas.

O vidro 13.93-B3 na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ não apresentou diferença significativa em nenhum dos três períodos de tempo avaliados. Mas para concentrações maiores, efeitos de diminuição de viabilidade celular foram observados. Em 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ houve o menor valor em 24 horas, com 70% de viabilidade. De acordo com o protocolo ISO 10993-5 de 2009, é necessário que ocorra uma diminuição de 30% da viabilidade celular para que o material seja considerado citotóxico [80]. O comportamento observado pode ser um indicio de que há dose-dependência na amostra de 13.93-B3, no qual há diminuição da atividade metabólica das células em função da concentração do vidro.

Similarmente, para o vidro 60B5F2P, com 100 μg , não houve diferença estatística significativa em relação ao grupo controle, o que demonstra que em baixas concentrações o vidro não afetou a viabilidade celular. Nas concentrações de 400, 700 e 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ é possível observar que houve diminuição da atividade metabólica das células em 12 e 24 horas, também mostrando dependência à concentração utilizada para o tratamento. Com 700 e 1000 μg , no período de 24 horas, houve diminuição da viabilidade celular para 68% e 62%, respectivamente, obtendo a menor viabilidade entre os três vidros bioativos estudados.

Ambos vidros de borato apresentaram uma diminuição na viabilidade celular, entretanto, este é um resultado esperado pois estudos indicam que a depender das concentrações de boro pode ocasionar em efeito negativo na densidade celular e viabilidade celular. Modglin et al [60] demonstrou que em concentrações de 0,05 M de H_3BO_4 (10 mg/ml de 13.93-B3) inibiu a proliferação de células MC3T3-E1. Apesar de vidros de borato possuírem esta taxa de citotoxicidade *in vitro*, os Autores afirmam que cerca de 90% do boro presente no corpo humano é excretado por meio da urina, e em testes *in vivo* o vidro borato 13.93-B3 demonstrou excelentes resultados, promovendo-o para uso comercial [20, 23, 60].

Considerando que a amostra 60B5F2P apresentou uma leve citotoxicidade (38% de perda de viabilidade celular) na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em 24 horas de incubação, os resultados obtidos para o vidro foram razoáveis.

Baseado nos resultados adquiridos pelo teste de viabilidade celular, a concentração de

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para todos os vidros bioativos foi escolhida para o teste de ferida.

3.3.2 Teste de Ferida

O teste de ferida é um ensaio padrão utilizado para avaliação de proliferação celular e migração celular [64,65]. A Figura 3.12 mostra as fotomicrografias obtidas do teste da ferida *in vitro* para 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dos vidros 60B5F2P, 45S5 e 13.93-B3 em meio de cultura com 5% e 10% de FBS após 72 horas, sendo o tempo zero o grupo controle.

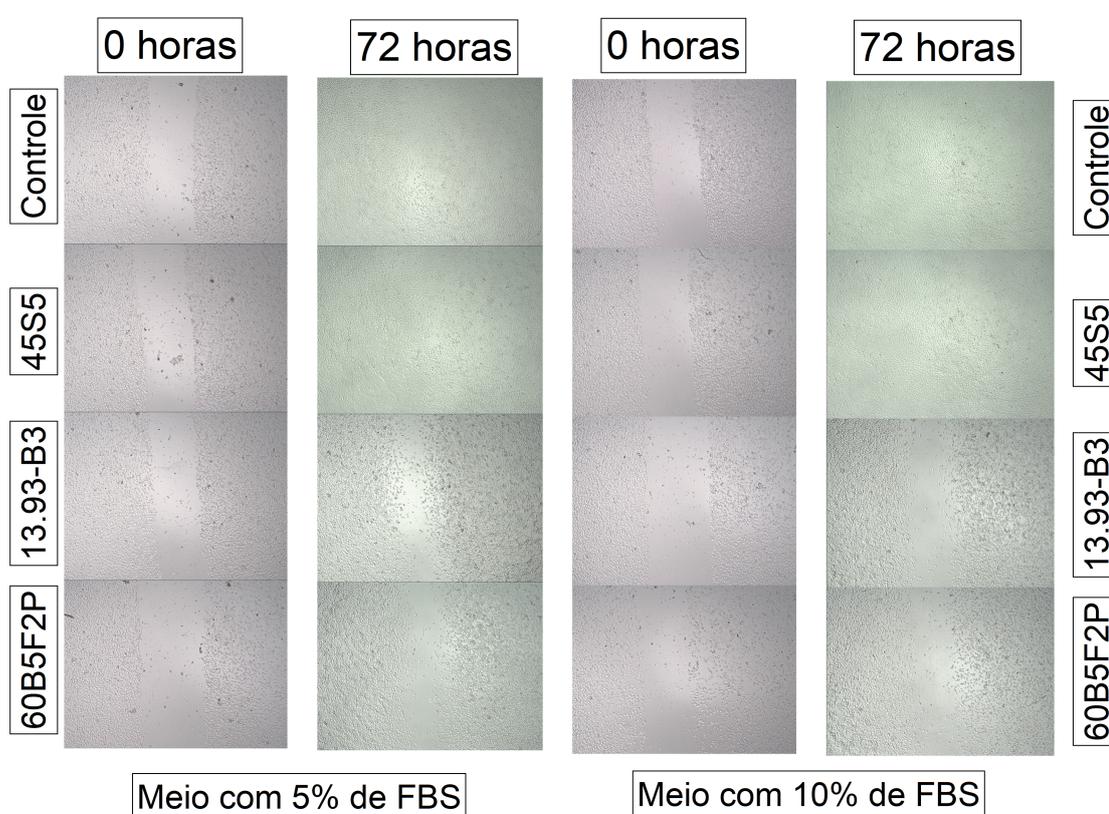


Figura 3.12: Imagens representativas dos experimentos realizados para análise do teste de ferida *in vitro* em cultura celular de células L-929 cultivadas em monocamada com os grupos controle, 45S5, 13.93-B3 e 60B5F2P em meio com 5% e 10% de FBS.

A Figura 3.13 mostra a área de fechamento da ferida, em percentual, para os vidros bioativos (100 μg) após 72 horas de incubação em 5% e 10% de FBS. O ensaio foi realizado em triplicata, com um total de $n=3$. Os testes estatísticos foram realizados comparando todos os grupos com o controle e entre si.

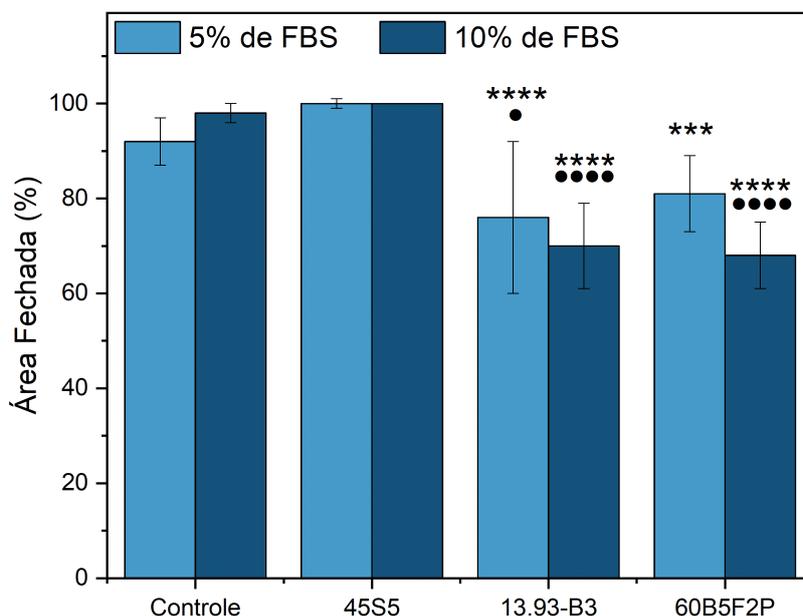


Figura 3.13: Área percentual coberta pelas células após o período de 72 horas. O símbolo * denota diferença estatística entre amostra *versus* 45S5 (***, **** sendo $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente), e • representa diferença estatística entre amostra *versus* grupo controle (•, •••, •••• sendo $p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente).

Em 72 horas, para o meio pobre (5%) e meio rico (10%) em FBS, o vidro bioativo 45S5 apresentou fechamento total da ferida, obtendo entre os três grupos de vidros bioativos as melhores taxas de fechamento, não havendo diferença estatística com o grupo controle. É possível que o experimento na presença do 45S5 não tenha sofrido nenhuma influência no fechamento de ferida, devido às baixas taxas de dissolução do vidro observadas em testes com o SBF. Entretanto, há algumas evidências que indicam que sob à exposição de materiais a base de silício, células fibroblásticas apresentaram um aumento na expressão de β -FGF [55,58]. Estatisticamente, não fica claro se houve influência do vidro no fechamento da ferida.

Entretanto, para os vidros borato, o fechamento da ferida foi substancialmente menor. No meio de 5%, o 13.93-B3 demonstrou diferença significativa com relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e 45S5 ($p < 0,0001$). Já para o vidro 60B5F2P, a diferença significativa foi menor em relação ao 45S5 ($p < 0,001$), e não houve diferença com o grupo controle.

Estes resultados indicam que o vidro 60B5F2P apresentou resultados, ligeiramente, melhores quando comparado ao grupo controle e 45S5. Já para os vidro de borato em meio de 10% de FBS, houve diferença significativa ($p < 0,0001$) dos dois vidros em comparação ao grupo controle e ao grupo 45S5.

Quando os resultados das médias dos meios de 5% e 10% de FBS são comparados há um indicativo de que há maior fechamento da ferida no meio pobre de FBS, ou seja, no meio menos nutritivo, sendo um resultado contra-intuitivo. Entretanto, existe a hipótese que esteja ocorrendo uma diminuição da proliferação e amplificação da migração celular no meio pobre, mas não foi observado diferença estatística entre os diferentes meios de um mesmo grupo de amostra.

Sumarizando, as células tratadas com o 13.93-B3 obtiveram uma diminuição na taxa de fechamento da ferida, todavia, o vidro 60B5F2P em meio de 5% não demonstrou diferença significativa para o grupo controle. Destaca-se, então, que 60B5F2P pode ser um material viável para a aplicação em ferimentos *in vivo*, assim como ocorreu para o vidro bioativo 13.93-B3, já disponível comercialmente.

Conclusão

O vidro bioativo 60B5F2P, transformado em pó, foi estudado com a finalidade de avaliar sua bioatividade e a resposta biológica em células de fibroblastos, os resultados foram comparados os vidros, já produzidos em escala comercial, 45S5 e 13.93-B3.

Os resultados mostraram que os vidros de borato (13.93-B3 e 60B5F2P) apresentaram uma dissolução maior que o vidro de silicato. Em 336 horas de imersão, a perda de massa atingiu 83% e 87% para os vidros 13.93-B3 e 60B5F2P, respectivamente. O vidro 45S5 perdeu somente 14% da sua massa original. Nesse mesmo período, detectou-se a formação de fosfato de cálcio nos três materiais estudados, porém ao final do período avaliado, os vidros borato demonstraram uma maior cristalinidade quando comparado com o vidro de silicato. A bioatividade avaliada dos vidros boratos mostrou-se mais rápida, devido à maior taxa de dissolução destes vidros.

Uma leve citotoxicidade foi observada para os vidros de borato, quando testado em células de fibroblastos de linhagem L-929, com indícios de dose-dependência. Todavia, os resultados do vidro 60B5F2P são resultados satisfatórios, pois apresentaram alta semelhança em relação ao vidro 13.93-B3, sendo o padrão borato escolhido para este estudo, já liberado para uso veterinário.

Por fim, na avaliação do fechamento da ferida não foi possível observar se houve interação do vidro 45S5 com a célula de fibroblastos por meio da metodologia adotada, enquanto o vidro 13.93-B3 demonstrou fechar com menor velocidade em relação ao controle, em ambos os experimentos com diferentes porcentagens de FBS no meio. Entretanto, resultados mistos foram observados para o vidro 60B5F2P, sendo que para o meio pobre de FBS não houve diferença estatística.

Considerando que o vidro bioativo 60B5F2P apresentou resultados comparáveis ao vidro 13-93B3 em termos de bioatividade, viabilidade celular e fechamento de feridas, destaca-se seu potencial para aplicação em tecidos epiteliais *in vivo*, especialmente em processos de cicatrização, assim como já demonstrado para o vidro 13-93B3.

Perspectivas futuras de estudo

O desenvolvimento deste trabalho representa um passo na direção de uma compreensão mais ampla para possíveis aplicações do vidro bioativo 60B5F2P. No entanto, como em qualquer pesquisa, há ainda diversas possibilidades para refinamentos dos resultados.

Tendo em vista a ótima bioatividade demonstrada pelo vidro, sugere-se a realização de mais testes biológicos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, a fim de elucidar melhor os efeitos que este biomaterial pode exercer sobre um organismo vivo.

Entre os testes *in vitro*, ainda estão sendo realizados ensaios de formadores de colônia para avaliar potenciais de proliferação do vidro. Espera-se poder realizar estudos de secreção de colágeno tipo I (ELISA) e citocinas anti-inflamatórias (TGF- β , VEGF, IL-6), avaliando a resposta inflamatória, uma vez que é de conhecimento que o boro incorporado a vidros bioativos tem potencial anti-inflamatório.

Outra perspectiva promissora é alteração da composição do vidro para complementar os efeitos terapêuticos desejados. Como exemplo de que poderia ser incorporado é o óxido de cobre (CuO) que possui, na literatura, altas taxas de melhora na resposta da angiogênese [46].

É fundamental considerar a aplicabilidade prática dos resultados obtidos. Investigações futuras podem focar no desenvolvimento de soluções tópicas do biomaterial para testes *in vivo*, validando-as em ambientes reais e avaliando seus impactos.

Por fim, ainda que este trabalho tenha atingido seus objetivos propostos, espera-se que este, abra possibilidades de continuidade, destacando principalmente o caráter interdisciplinar da pesquisa.

Apêndice A - Fisiopatologia de feridas

Este capítulo tem como objetivo de fundamentar os processos de uma ferida em cicatrização. Entender como alguns dos processos de sinalização funcionam, são pontos-chaves essenciais para a manufatura de materiais e fármacos com o intuito de se aplicar para este propósito.

Estágios da cicatrização

A pele é o maior órgão do corpo humano, cuja sua principal função é de agir como uma barreira [14], e existem uma série de eventos e processos bioquímicos que são necessários ocorrerem em uma ferida, para que possa ser restaurado a barreira protetora do corpo: a pele. Estes eventos, ou estágios da cicatrização, podem ser distinguidos em 4 etapas diferentes, mas que são simultâneas [15].

Hemostase

É o primeiro passo para o processo de cicatrização e cura de um ferimento. Após o ferimento acontecer na pele, conseqüentemente ocorrem as rupturas de vasos sanguíneos, que por sua vez ocasionam no contato entre as plaquetas com proteínas que não pertencem ao lúmen¹ dos vasos sanguíneos, como o colágeno fibrilar e a fibronectina [14, 15]. Este contato, ocasiona nas plaquetas se aderirem e agregarem na parede rompida e liberarem

¹Em Biologia, lúmens são os espaços internos de estruturas tubulares, tal como as vasos sanguíneos.

o conteúdo do interior dos grânulos α , que ocasiona na constrição do vaso rompido. Tais conteúdos, incluem os fatores de transformação de crescimento α e β (TGF- α e TGF- β), o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), serotonina, a tromboxano A2 (TXA2) e o monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico) [15, 55].

Simultaneamente, as vias bioquímicas da coagulação são ativadas. A proteína trombina age na conversão do fibrinogênio em fibrinas, que formam uma matriz, também chamado de coágulo, a base de fibrinas e plaquetas que previnem subsequente perda de volume sanguíneo. O coágulo de fibrina também atua como um meio para a subsequente migração das células [15, 55, 81, 82].

A hemóstase é a primeira etapa do processo de cicatrização, pois é neste estágio, que se dá início aos próximos processos, pois um ambiente propício é criado [15].

Inflamação

A resposta inflamatória, é um processo necessário, que previne infecções ao tentar curar a ferida de maneira mais rápida o possível [15]. Cerca de 30 minutos do pós-ferimento, devido a liberação de PDGF e TGF- β pelas plaquetas, e também, com os mastócitos² secretando histamina, fator de necrose tumoral (TNF), leucotrieno e interleucina (IL), os fatores quimiotáticos³ ocasionam em um fluxo de neutrófilos⁴ [14, 15, 83], que por sua vez acaba ativando vias de sinalização e recepção relacionadas ao TGF- β . Isto permite que as células detectem um gradiente de concentração de TGF- β e iniciem uma migração para a fonte, as plaquetas no local do ferimento [15, 84].

Os neutrófilos possuem como função primária, a eliminação de patógenos na ferida, e sua presença pode durar até 5 dias, e, após terem completado sua função, entram em apoptose [15, 85].

Os processos efetuados pelas plaquetas, neutrófilos e mastócitos, liberam sinais que permitem atrair monócitos para o local do ferimento, que ao transitar em direção ao local

²Células secretoras multifuncionais pertencentes ao sistema imunológico

³Substâncias que possuem a capacidade de atrair ou de repelir células.

⁴Células sanguíneas leucocitárias que fazem parte do sistema imunológico inato.

do ferimento, efetua uma diferenciação para macrófagos M1 [15].

Sendo componentes essenciais para regular o processo inflamatório, os macrófagos M1 atuam no local por meio dos receptores do tipo Toll⁵ (TLRs). Os TLRs atuam então no local reconhecendo os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), permitindo assim que seja efetuado uma nova limpeza de patógenos, e também reconhecendo os padrões moleculares associados à danos (DAMPs), eliminando detritos da matriz celular [86].

Os macrófagos M1 possuem função bimodal, e sua função depende do estado do ferimento. Quando realizada sua principal função, os macrófagos M1 então passam por um processo de mudança de fenótipo, se tornando macrófagos M2, que possui natureza anti-inflamatória. Neste processo, ocorre um aumento de PDGF, VEGF, TGF- α e TGF- β , e se inicia a fase de proliferação [15].

Proliferação

Nesta fase, uma migração e proliferação de fibroblastos permite que comece a reconstrução da ferida e um colágeno recém formado substituí a matriz de fibrina criada durante o processo de hemóstase. Todo este complexo processo envolve diversos mecanismos que podem ser separados em etapas de reepitelização, deposição matricial, angiogênese e de contratura da ferida [55].

Reepitelização

Para se evitar perdas subsequentes de água, prevenir infecções e regular a temperatura, é necessário que ocorra a reestruturação da barreira epidermal, para isto, metaloproteinase matriciais⁶ (MMP) e plasmina⁷ realizam a degradação da matriz de fibrina e fornecem um espaço para que células epiteliais possam migrar e proliferar no espaço da ferida [15].

A MMP-9 (colagenase tipo IV), altamente expressada por células epiteliais, atua no colágeno tipo IV da lâmina basal e âncora o colágeno tipo VII da fibrila, permitindo uma

⁵Receptores do tipo Toll, são proteínas transmembrânicas, receptores de reconhecimento de várias vias de padrões e estão presente na superfície de vários tipos de células.

⁶Endo peptídeos dependentes de zinco.

⁷Enzimas presentes no sangue com potencial de proteólise.

separação dos queratinócitos da lâmina basal, e conseqüentemente a migração, que por sua vez acaba expressando o MMP-1, atuante no colágeno tipo I e III [15].

Posteriormente, os queratinócitos basais começam a proliferar em resposta aos fatores de crescimento e acaba por fechar a ferida. Os fatores de crescimento fibroblástico 7 (FGF-7) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), além do TGF- α , estão presentes nesta etapa [15].

Deposição Matricial

A matriz extracelular (ECM) é uma larga rede de biomoléculas que permitem o suporte e a estrutura necessária para células e tecidos. O desenvolvimento desta matriz, tem como participação principal as células de fibroblastos, que por meio de respostas aos fatores de crescimento e da fibrina e fibronectina, migra para o local da ferida e começam a se proliferar na borda do ferimento [15, 87, 88].

A matriz que é então depositado pelos fibroblastos, possui alta vascularidade e possui em sua composição a fibrina, fibronectina, ácido hialurônico e o colágeno tipo III [15].

Angiogênese

O oxigênio, assim como os nutrientes, são componentes essenciais para que as células possam realizar suas devidas funções metabólicas [15]. Para que o transporte destes componentes ocorra, é necessário que possua a vascularização necessária para levar os nutrientes para as células, desta forma, a angiogênese é vital para a cicatrização, sendo a angiogênese, o processo de criação de vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes, vascularizando a região da ferida [15].

Contração de Ferida

Até 40% da área da lesão pode ser reduzida pelo processo de contração, que tem como objetivo aproximar os tecidos epiteliais não danificados e reduzir a distância necessária a ser reepitelizada [15, 82].

Uma porcentagem dos fibroblastos se convertem em miofibroblastos e liberam a actina-

alfa do músculo liso, que por sua vez gera forças de contração em resposta ao fator TGF- β 1 [89].

Quando o processo de contração não é mais necessário, um influxo de cálcio se segue até as células, dessensibilizando os receptores delas para PDGF e EGF [90].

Remodelação

O último estágio, que dependendo do tipo de ferimento, pode levar até mais de 1 ano para finalizar, é marcado por um balanço altamente sensível de 1:1 de MMPs para os inibidores tecidual de metaloproteínase (TIMPs) [15, 55]. Ocorre uma sucessão de substituições, o ácido hialurônico por sulfato de heparan, sulfato de dermatan e por ácido condroitinossulfúrico, e o colágeno III para colágeno I. Isto resulta na formação, degradação e remodelação do colágeno, para a formação de cicatrizes [15].

Referências Bibliográficas

- [1] J. E. Shelby, *Introduction to Glass Science and Technology*. Cambridge, United Kingdom: The Royal Society of Chemistry, 2005.
- [2] O. D. Abodunrin, K. E. Mabrouk, and M. Bricha, “A review on borate bioactive glasses (bbg): effect of doping elements, degradation, and applications,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 11, pp. 955–973, Janeiro 2023.
- [3] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is sbf in predicting in vivo bone bioactivity,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 2907–2915, Janeiro 2006.
- [4] P. N. Portes, *Caracterização e Avaliação da Bioatividade in vitro do sistema vítreo: $60B_2O_3 - 5CaF_2 - (20 - x)Na_2O - (15 - x)CaO - 2xP_2O_5$ ($x = 0, 1, 2$)*. Maringá, Paraná, Brasil: Universidade Estadual de Maringá, 2018.
- [5] S. R. Gavinho, M. P. F. Graça, P. R. Prezas, J. S. Kumar, B. M. G. Melo, A. J. M. Sales, A. F. Almeida, and M. A. Valente, “Structural, thermal, morphological and dielectric investigations on 45s5 glass and glass-ceramics,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 562, Junho 2021.
- [6] D. Bellucci, G. Bolelli, V. Cannillo, A. Cattini, and A. Sola, “In situ raman spectroscopy investigation of bioactive glass reactivity: Simulated body fluid solution vs tris-buffered solution,” *Materials Characterization*, vol. 62, pp. 1021–1028, Julho 2011.
- [7] B. N. Meera and J. Ramakrishna, “Raman spectral studies of borate glasses,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 159, no. 1, pp. 1–21, 1993.

- [8] A. Saranti, I. Koutselas, and M. A. Karakassides, “Bioactive glasses in the system $\text{CaO-B}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$: Preparation, structural study and in vitro evaluation,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 352, pp. 390–398, 2006.
- [9] X. Liu, M. N. Rahaman, and D. E. Day, “Conversion of melt-derived microfibrinous borate (13.93b3) and silicate (45s5) bioactive glass in a simulated body fluid,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 24, pp. 583–595, Dezembro 2012.
- [10] M. R. Filgueiras, G. L. Torre, and L. L. Hench, “Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 27, pp. 445–453, Abril 1993.
- [11] A. M. Abdelghany and H. Kamal, “Spectroscopic investigation of synergetic bioactivity behavior of some ternary borate glasses containing fluoride anions,” *Ceramics International*, vol. 40, pp. 8003–8011, Julho 2014.
- [12] X. Han and D. E. Day, “Reaction of sodium calcium borate glasses to form hydroxyapatite,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 18, pp. 1837–1847, Setembro 2007.
- [13] B. D. R. . G. Zhang, “1.1.2 - a history of biomaterials,” in *Biomaterials Science (Fourth Edition)* (W. R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, and M. J. Yaszemski, eds.), pp. 21–34, Academic Press, fourth edition ed., 2020.
- [14] G. T. S. Kirby, S. J. Mills, A. J. Cowin, and L. E. Smith, “Stem cells for cutaneous wound healing,” *BioMed Research International*, vol. 2015, p. 11, Junho 2015.
- [15] A. J. C. Stuart J. Mills, Ben R. Hofma, *Mechanism of Vascular Diseases - A Textbook for Vascular Specialists*. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, terceira edição ed., 2020.
- [16] C. Lindholm and R. Searle, “Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency,” *International Wound Journal*, vol. 13, pp. 5–15, Julho 2016.

- [17] T. N. Demidova-Rice, M. R. Hamblin, and I. M. Herman, “Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care,” *Advances in Skin and WoundCare*, vol. 25, pp. 304–314, Julho 2012.
- [18] F. Baino, “Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine,” 9 2018.
- [19] L. L. Hench, “The story of bioglass,” *Materials in Medicine*, vol. 17, pp. 967–978, Novembro 2006.
- [20] S. Kargozar, S. Hamzehlou, and F. Baino, “Can bioactive glasses be useful to accelerate the healing of epithelial tissues?,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 97, pp. 1009–1020, Abril 2019.
- [21] D. Ege, K. Zheng, and A. R. Boccaccini, “Borate bioactive glasses (bbg): Bone regeneration, wound healing applications, and future directions,” *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 5, pp. 3608–3622, Julho 2022.
- [22] K. S. Thind, G. Sharma, K. Singh, V. Rajendran, and S. Aravindan, “Soluble borate glasses: In vitro analysis,” *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 90, pp. 467–471, Janeiro 2007.
- [23] P. Wray, “‘cotton candy’ that heals? borate glass nanofibers look promising.,” *American Ceramic Society Bulletin*, vol. 90, pp. 25–29, Maio 2011.
- [24] M. Cerruti, D. Greenspan, and K. Powers, “Effect of ph and ionic strength on the reactivity of bioglass® 45s5,” *Biomaterials*, vol. 26, pp. 1665–1674, Maio 2005.
- [25] M. Cerruti, D. Greenspan, and K. Powers, “An analytical model for the dissolution of different particle size samples of bioglass in tris-buffered solution,” *Biomaterials*, vol. 26, pp. 4903–4911, Agosto 2005.

- [26] A. C. C. da Cruz, M. T. Pochapski, J. B. Daher, J. C. Z. da Silva, G. L. Pilatti, and F. A. Santos, “Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of hydroxyapatites,” *Journal of Oral Science*, vol. 48, pp. 219–226, Dezembro 2006.
- [27] R. N. Granito, D. A. Ribeiro, A. C. M. Rennó, C. Ravagnani, P. S. Bossini, O. Peitl-Filho, N. A. P. Edgar D Zanotto, and J. Oishi, “Effects of biosilicate and bioglass 45s5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 20, pp. 2521–2526, Julho 2009.
- [28] J. R. Jones and A. G. Clare, *Bio-Glasses: An Introduction*. John Wiley and Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom: John Wiley and Sons, Ltd., 2012.
- [29] G. W. Morey, “The constitution of glass,” *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 17, pp. 315–328, Dezembro 1934.
- [30] A. R. C. Jr., “W.h. zachariasen - the melody lingers on,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 49, pp. 1–17, Maio 1982.
- [31] W. Zachariasen, “The atomic arrangement in glass,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 54, pp. 3841–3851, Outubro 1932.
- [32] L. Granados, R. Morena, N. Takamure, T. Suga, S. Huang, D. R. McKenzie, and A. Ho-Baillie, “Silicate glass-to-glass hemertic bonding for encapsulation of next-generation optoelectronics: A review,” *Materials Today*, vol. 47, pp. 131–155, Julho-Agosto 2021.
- [33] A. R. Bocaccini, D. S. Brauer, and L. Hupa, “Bioactive glasses – fundamentals, technology and applications,” *Royal Society of Chemistry*, 2017.
- [34] J. Weber and J. Wahl, “Neurosurgical aspects of trepanations from neolithic times,” *International Journal of Osteoarcheology*, vol. 16, pp. 536–545, Maio 2006.

- [35] G. Basalla, *The Evolution of Technology*. The Edingburgh Building, Cambridge, CB2 2RU UK: Cambridge University Press, 2002.
- [36] L. L. Hench, *An Introduction to Bioceramics*. Imperial College Press, 2013.
- [37] T. S. Hin, *Engineering materials for biomedical applications*. World Scientific, 2004.
- [38] R. Agrawal, A. Kumar, M. K. A. Mohammed, and S. Singh, “Biomaterial types, properties, medical applications, and other factors: a recent review,” *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A*, vol. 24, pp. 1027–1042, Março 2023.
- [39] M. Gutierrez, M. Lopes, S. H. Nandyala, and L. Almeida, “substitutos Ósseos conceitos gerais e estado actual,” *Arquivos de Medicina*, vol. 19, pp. 153–162, Julho 2005.
- [40] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, and J. A. Planell, “Biomaterials in orthopaedics,” *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 5, p. 1137–1158, Julho 2008.
- [41] B. L. Zimba, M. J. Rwiza, and E. Sauli, “Utilizing tilapia fish skin biomaterial for burn wound dressing: A systematic review,” *Scientific African*, vol. 24, Junho 2024.
- [42] S. Zhu, Y. Liu, Z. Gu, and Y. Zhao, “A bibliometric analysis of advanced healthcare materials: Research trends of biomaterials in healthcare application,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 11, Setembro 2022.
- [43] H. Yin, X. Yang, L. Peng, C. Xia, D. Zhang, F. Cui, H. Huang, and Z. Li, “Trends of calcium silicate biomaterials in medical research and applications: A bibliometric analysis from 1990 to 2020,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 13, Outubro 2022.
- [44] M. T. Islam, R. M. Felfel, E. A. Abou Neel, D. M. Grant, I. Ahmed, and K. M. Hossein, “Bioactive calcium phosphate-based glasses and ceramics and their biomedical applications: A review,” *Journal of Tissue Engineering*, vol. 8, 1 2017.
- [45] W. Huang, D. E. Day, K. Kittiratanapiboon, and M. N. Rahaman, “Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45s5), borate, and borosilicate glasses to hy-

- droxyapatite in dilute phosphate solutions,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 17, pp. 583–596, Julho 2006.
- [46] A. Ali, B. N. Singh, S. Yadav, M. Ershad, S. K. Singh, S. P. Mallick, and R. Pyare, “CuO assisted borate 1393B3 glass scaffold with enhanced mechanical performance and cytocompatibility: An In vitro study,” *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 114, 2 2021.
- [47] S. R. Moosvi and R. M. Day, “Bioactive glass modulation of intestinal epithelial cell restitution,” *Acta Biomaterialia*, vol. 5, pp. 76–83, Janeiro 2009.
- [48] S. Verrier, J. J. Blaker, V. Maquet, L. L. Hench, and A. R. Bocaccini, “Pdlla/bio-glass composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an in vitro cell biology assessment,” *Biomaterials*, vol. 25, pp. 3013–3021, Julho 2004.
- [49] S. Kargozar, S. Hamzehlou, and F. Baino, “Potential of bioactive glasses for cardiac and pulmonary tissue engineering,” 12 2017.
- [50] H. dos Santos, *Estudo da Influência na resposta bioativa de vitrocerâmicas produzidas a partir do sistema vítreo boro-sódio-cálcio com diferentes tamanhos de partículas*. Maringá, Paraná, Brasil: Universidade Estadual de Maringá, 2023.
- [51] M. S. Gibin, *Influência do tratamento térmico na sinterização, cristalização e na bioatividade de vidros de Cálcio-Sódio-Borato*. Maringá, Paraná, Brasil: Universidade Estadual de Maringá, 2021.
- [52] F. Boraldi, F. D. Lofaro, S. Bonacorsi, A. Mazzilli, M. Garcia-Fernandez, and D. Quaglino, “The role of fibroblasts in skin homeostasis and repair,” *Biomedicines*, vol. 12, p. 1586, Julho 2024.
- [53] H. Hu, Y. Tang, L. Pang, C. Lin, W. Huang, D. Wang, and W. Jia, “Angiogenesis and full-thickness wound healing efficiency of a copper-doped borate bioactive glass/poly(lactic-co-glycolic acid) dressing loaded with vitamin e in vivo and in vitro,” *ACS Applied Materials Interfaces*, vol. 10, p. 22939–22950, Junho 2018.

- [54] H. Wang, L. li Qi, C. Shema, K. ying Jiang, P. Ren, H. Wang, and L. Wang, “Advances in the role and mechanism of fibroblasts in fracture healing,” *Frontiers in Endocrinology*, vol. 26, p. 1350958, Fevereiro 2024.
- [55] M. Linju and M. Rekha, “Role of inorganic ions in wound healing: an insight into the various approaches for localized delivery,” *Therapeutic Delivery*, vol. 14, pp. 649–667, Maio 2015.
- [56] E. Bissé, T. Epting, G. L. Annette Bei and, H. Lang, and H. Wieland, “Reference values for serum silicon in adults,” *Anal. Biochem.*, vol. 337, pp. 130–135, Fevereiro 2005.
- [57] A. B. G. Lansdown and A. Williams, “A prospective analysis of the role of silicon in wound care,” *Journal of Wound Care*, vol. 16, Setembro 2013.
- [58] M. M. Hanasono, J. Lum, L. A. Carroll, A. A. Mikulec, and R. J. Koch, “The effect of silicone gel on basic fibroblast growth factor levels in fibroblast cell culture,” *Archives of Facial Plastic Surgery*, vol. 6, pp. 88–93, Março 2004.
- [59] B. Hilal, A. Eldem, T. Oz, M. Pehlivan, and I. Pirim, “Boric acid affects cell proliferation, apoptosis, and oxidative stress in all cells,” *Biological Trace Element Research*, vol. 202, pp. 3614–3622, Nobembro 2023.
- [60] V. C. Modglin, R. F. Brown, S. B. Jung, and D. E. Day, “Cytotoxicity assessment of modified bioactive glasses with MLO-A5 osteogenic cells in vitro,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 24, no. 5, pp. 1191–1199, 2013.
- [61] E. P. Brass, W. B. Forman, R. V. Edwards, and O. Lindan, “Fibrin formation: effect of calcium ions,” *Blood*, vol. 52, pp. 654–658, Outubro 1978.
- [62] C. Navarro-Requena, S. Pérez-Amodio, O. Castaño, and E. Engel, “Wound healing-promoting effects stimulated by extracellular calcium and calcium-releasing nanoparticles on dermal fibroblasts,” *Nanotechnology*, vol. 28, Setembro 2018.

- [63] H. Hennings, D. Michael, C. Cheng, P. Steinert, K. Holbrook, and S. H. Yuspa, “Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture,” *Cell*, vol. 19, pp. 245–254, Janeiro 1980.
- [64] C. C. Liang, A. Y. Park, and J. L. Guan, “In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro,” *Nature Protocols*, vol. 2, pp. 329–333, 3 2007.
- [65] M. Raymond, T. Marchbank, M. P. Moyer, R. J. Playford, I. R. Sanderson, and 1and Laurens Kruidenier, “Il-1b stimulation of ccd-18co myofibroblasts enhances repair of epithelialmonolayers through wnt-5a,” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 303, pp. 1270–1278, Dezembro 2012.
- [66] M. Fábian, K. Z, J. Lábar, and et al, “Network structure and thermal properties of bioactive (SiO₂ – CaO – Na₂O – P₂O₅ glasses.,” *Journal of Material Science*, vol. 55, pp. 2303–2320, Fevereiro 2020.
- [67] L. Lebfèvre, J. Chevalier, L. Gremillard, R. Zenati, G. Thollet, D. Bernarche-Assolant, and A. Govin, “Structural transformations of bioactive glass 45s5 with thermal treatments,” *Acta Materialia*, vol. 55, pp. 3305–3313, Março 2007.
- [68] A. M. Deliomarh, “Synthesis and characterization of cerium- and gallium-containing borate bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 26, Janeiro 2015.
- [69] M. Cicconi and D. R. Neuville, *Springer Handbook of Glass*. 2019.
- [70] A. Stiller, M. Engblom, E. Vainio, and L. Hupa, “Understanding the crystallization behavior of bioactive glass s53p4 powder compacts under various heating conditions,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 644, p. 123178, Novembro 2024.
- [71] E. I. Kamitsos and G. D. Chryssikos, “Borate glass structure by Raman and infrared spectroscopies*,” tech. rep., 1991.

- [72] J. R. Jones, P. Sepulveda, and L. L. Hench, “Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 58, no. 6, pp. 720–726, 2001.
- [73] A. M. Deliormanli, “Size-dependent degradation and bioactivity of borate bioactive glass,” *Ceramics International*, vol. 39, pp. 8087–8095, Setembro 2013.
- [74] T. H. Qazi, S. Hafeez, J. Schmidt, G. N. Duda, A. R. Bocaccini, and E. Lippens, “Comparison of the effects of 45s5 and 1393 bioactive glass microparticles on hmsc behavior,” *Journal of Biomedical Material Research A*, vol. 105, pp. 2772–2782, Julho 2017.
- [75] A. Sobczak-Kupiec, D. Malina, R. Kijkowska, W. Florkiewicz, K. Pluta, and Z. Wzorek, “Hydroxyapatite/silver nanoparticles powders as antimicrobial agent for bone replacements,” *Croat. Chem. Acta*, vol. 92, pp. 59–68, Fevereiro 2019.
- [76] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, L. Vichi, and M. Sandri, “Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite,” *Biomaterials*, vol. 25, p. 1763–1770, Janeiro 2004.
- [77] M. Vallet-Regí, A. M. Romero, C. V. Ragel, and R. Z. LeGeros, “Xrd, sem-eds, and ftir studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 44, pp. 416–421, Março 1999.
- [78] Z. Barabadi, M. Azami, E. Sharifi, R. Karimi, N. Lotfibakhshaiesh, R. Roozafzoon, M. T. Joghataei, and J. Ai, “Fabrication of hydrogel based nanocomposite scaffold containing bioactive glass nanoparticles for myocardial tissue engineering,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 69, pp. 1137–1146, 2016 Dezembro.
- [79] Q. Chen, L. Jin, W. D. Cook, D. Mohn, E. L. Lagerqvist, D. A. Elliott, J. M. Haynes, N. Boyd, W. J. Stark, C. W. Pouton, E. G. Stanlye, and A. G. Elefantye, “Elastomeric nanocomposites as cell delivery vehicles and cardiac support devices,” *Soft Matter*, vol. 6, pp. 4715–4726, Agosto 2010.

- [80] I. O. for Standardization, “Biological evaluation of medical devices - part 5. tests for in vitro cytotoxicity,” vol. 3^a Edição, 2009.
- [81] J. Gailit, M. P. Welch, and R. A. Clark, “Tgf-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds,” *J Invest Dermatol*, vol. 103, pp. 221–227, Agosto 1994.
- [82] J. Li, J. Chen, and R. Kirsner, “Pathophysiology of acute wound healing,” *Journal of Clinics in Dermatology*, vol. 25, pp. 9–18, Janeiro 2007.
- [83] H. M. Thomas, A. J. Cowin, and S. J. Mills, “The importance of pericytes in healing: Wounds and other pathologies,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, p. 1129, Maio 2017.
- [84] S. M. Wahl, D. A. Hunt, L. M. Wakefield, N. McCartney-Francis, L. M. Wahl, A. B. Roberts, and M. B. Sporn, “Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, pp. 5788–5792, Agosto 1987.
- [85] R. Goldman, “Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future,” *Advanced Skin Wound Care*, vol. 17, pp. 24–35, Janeiro 2004.
- [86] L. Chen and L. A. DiPietro, “Toll-like receptor function in acute wounds,” *Advanced Wound Care*, vol. 6, pp. 344–355, Outubro 2017.
- [87] J. Xu and R. A. Clark, “Extracellular matrix alters pdgf regulation of fibroblast integrins,” *Journal of Cell Biology*, vol. 132, pp. 239–249, Janeiro 1996.
- [88] M. V. Plikus, X. Wang, S. Sinha, E. Forte, S. M. Thompson, E. L. Herzog, R. R. Driskell, N. Rosenthal, J. Biernaskie, and V. Horsley, “Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease,” *Cell*, vol. 184, pp. 3852–3872, Julho 2021.
- [89] A. Desmoulière, A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani, “Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue

myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts,” *Journal of Cell Biology*, vol. 122, pp. 103–111, Julho 1993.

- [90] Y. C. Lin and F. Grinnell, “Decreased level of pdgf-stimulated receptor autophosphorylation by fibroblasts in mechanically relaxed collagen matrices,” *Journal of Cell Biology*, vol. 122, pp. 663–672, Agosto 1993.