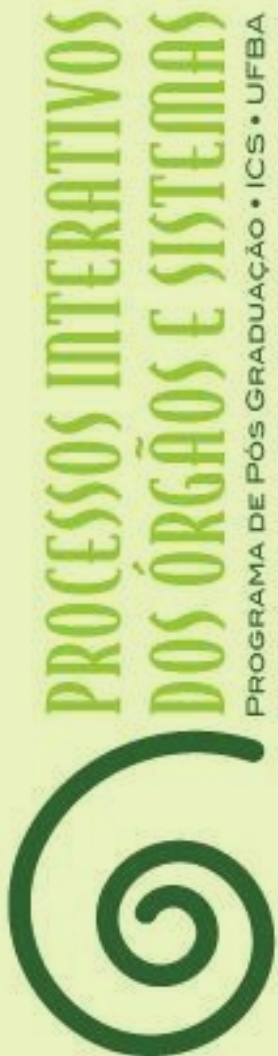


Mauricio Mitsuo Monção

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO  
BIOLÓGICO E DAS MODIFICAÇÕES  
COMPOSICIONAIS DE VITROCERÂMICAS  
À BASE DE WOLLASTONITA E DE  
FOSFATO TRICÁLCICO PARA  
REGENERAÇÃO ÓSSEA**



Salvador  
2021

**MAURICIO MITSUO MONÇÃO**

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO E DAS  
MODIFICAÇÕES COMPOSICIONAIS DE VITROCERÂMICAS À  
BASE DE WOLLASTONITA E DE FOSFATO TRICÁLCICO PARA  
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, como requisito  
parcial para obtenção do título de Doutor.

**Orientador:** Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo

**Coorientador:** Profa. Dra. Isabela Cerqueira Barreto

Salvador

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Monção, Mauricio Mitsuo.

Avaliação do comportamento biológico e das modificações composicionais de vitrocerâmicas à base de wollastonita e de fosfato tricálcico para regeneração óssea / Mauricio Mitsuo Monção. - 2021.

123 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabela Cerqueira Barreto.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2021.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Regeneração óssea. 3. Cerâmica vitrificada. 4. Silicato de cálcio. 5. Fosfato tricálcico. I. Araújo, Roberto Paulo Correia de. II. Barreto, Isabela Cerqueira. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. IV. Título.

CDD 610.28 - 23. ed.

## **MAURICIO MITSUO MONÇÃO**

### **Avaliação do comportamento biológico e das modificações composicionais de vitrocerâmicas à base de wollastonita e fosfato tricálcico para regeneração óssea.**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Salvador, 20 de dezembro de 2021.

#### **Banca Examinadora**

**Roberto Paulo Correia de Araújo** - Orientador

Doutor em Odontologia, pela Universidade Federal da Bahia.  
Universidade Federal da Bahia.

**Isabela Cerqueira Barreto** - Coorientadora

Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, pela Universidade Federal da Bahia.  
Universidade Federal da Bahia.

**Fúlvio Borges Miguel**

Doutor em Patologia, pela Universidade Federal da Bahia  
Universidade Federal da Bahia.

**Marcelo Henrique Prado da Silva**

Doutor em Engenharia Metalúrgica e Materiais pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.  
Instituto Militar de Engenharia.

**George Gonçalves dos Santos**

Doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, pela Universidade Federal da Bahia.  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

***Dedico este trabalho***

A minha querida mãe, Maria Tosico Monção, e a meu irmão, Marcelo Teruo (*in memoriam*), com todo meu amor e gratidão.

Às minhas queridas irmãs, Meire Mayume, Marilza Leiko e Maristela Sayure, verdadeiras guerreiras que também escolheram os estudos como instrumento transformador da vida.

Para nossa querida Profa. Fabiana Paim Rosa, pela dedicação ao trabalho docente, à pesquisa, e por todas as obras que construiu no Instituto de Ciências da Saúde/UFBA. Seu legado está presente e faz diferença na vida muitas pessoas!

## AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus, pela dádiva da vida e infinito amor! Obrigado pela minha liberdade de espírito e oportunidade de obter conhecimento ao longo desta trajetória. Obrigado pelas entidades de luz que auxiliam e confortam neste momento de pandemia em que tivemos tantas perdas irreparáveis.

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo que, gentilmente, aceitou ser meu orientador. Sou grato pelo apoio incondicional, por acreditar no meu potencial e por reconhecer a importância da continuidade do projeto que resultou nesta tese. Para além da orientação técnico-científica, é uma grande honra tê-lo como exemplo de carreira docente, dedicação ao serviço e ao ensino público brasileiro. Todo meu respeito e reconhecimento a esse professor!

À minha coorientadora, Profa. Dra. Isabela Cerqueira Barreto, pela confiança, paciência, incentivo e por tantas vezes ter se colocado à disposição! Obrigado pelo apoio, tempo extra e cuidadoso acompanhamento, elementos fundamentais para a conclusão desta tese e para meu desenvolvimento como pesquisador.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira, pela parceria e acolhimento no Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular da UFJF – MG. Obrigado pela gentileza, pela disponibilidade e por conceder o uso dos recursos para realização das análises empregadas nesta pesquisa. Sei o quão difícil é construir e manter estruturas laboratoriais em funcionamento nas instituições públicas. Obrigado pelo apoio e por acreditar no potencial do nosso projeto.

À Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa, pela oportunidade de participar das atividades do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB), do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Embora aposentada por motivo de saúde, foram os recursos providenciados e deixados à nossa disposição que permitiram a continuidade desta pesquisa. Minha eterna gratidão! A dedicação da Profa. Fabiana à ciência resultou numa importante rede de pesquisadores na área de biomateriais. Por conseguinte, estendo meus sinceros agradecimentos ao Dr. Raúl García Carrodegas, pesquisador da empresa Noricum S. L., localizada em San Sebastián de los Reyes, Madrid, Espanha, pela cooperação com o LBTB e pela disponibilização das amostras do biomaterial utilizadas nesta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb), pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

Agradecimentos especiais aos pesquisadores do Laboratório de Física Radiológica (LAFIR) e Laboratório de Caracterização de Materiais (LCM) do IFBA, *campus* Salvador.

Aos colegas do programa de doutorado, em especial, a Juliana dos Santos Muller, Luisa Queiroz Vasconcelos e Raisia Cavalcante Dourado, que sempre me apoiaram e incentivaram durante os momentos desafiadores na condição aluno. Pelos trabalhos e disciplinas realizados em conjunto e, principalmente, pela amizade!

À Profa. Dra. Julita Maria Freitas Coelho, por quem tenho grande estima e admiração. Seu altruísmo, benevolência e dedicação são inspiração para muitos.

Aos colegas Guillermo Alberto Lopez, Marcus Vinícius Linhares de Oliveira, Carina Soares do Nascimento, Fernando da Silva Ramos, Paulo Mauricio Geambastiani, Renata dos Santos Almeida e Iorrana Indira dos Anjos Ribeiro, por compartilharem experiências e conhecimentos.

À comunidade do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, em especial aos colegas do Departamento de Tecnologia em Saúde e Biologia do *campus* Salvador. Com certeza, minhas realizações acadêmicas e profissionais estão atreladas às contribuições de muitos!

Aos amigos residentes nas cidades Macapá e São Paulo: vocês são importantes para mim. Impossível não agradecer àqueles que torcem e estão comigo ao longo dessa existência, pessoas que convivo há tempos e que aprendi a amar.

Ao meu companheiro Fábio da Mata, pela paciência, compreensão e apoio em tantos momentos desta caminhada. Obrigado por permanecer ao meu lado e compartilhar a alegria de viver!

Por fim, estendo meus agradecimentos a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

MONÇÃO, Mauricio Mitsuo. **Avaliação do comportamento biológico e das modificações composicionais de vitrocerâmicas à base de wollastonita e fosfato tricálcico para regeneração óssea.** 123 f. 2021. Orientador: Roberto Paulo Correia de Araújo. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2022.

## RESUMO

**Introdução:** Os minerais wollastonita (W) e fosfato tricálcico (TCP) têm reconhecida biocompatibilidade e diferentes comportamentos em fluido biológico. Sendo assim, foram desenvolvidas vitrocerâmicas na forma de grânulos, com diferentes proporções percentuais em peso de W e TCP, a fim de obter diferentes comportamentos de solubilidade, bioatividade e biodegradabilidade, durante a reparação óssea em defeito ósseo crítico. **Objetivo:** Avaliar as propriedades vibracionais e estruturais, bem como o comportamento biológico e modificações composicionais *in vivo*, de vitrocerâmicas na forma de grânulos, com diferentes proporções percentuais em peso de W e TCP. **Materiais e método:** Utilizaram-se 76 ratos *Wistar*, machos, divididos em quatro grupos experimentais, de acordo com a vitrocerâmica implantada - W20/TCP80, W40/TCP60, W60/TCP40 e W80/TCP20; e grupos controle positivo, íntegro e negativo, defeito ósseo vazio. As amostras obtidas foram avaliadas macroscopicamente e por radiografia digital, aos sete dias pós-implantação, e por espectroscopia Raman nos pontos biológicos de 07, 15, 45 e 120 dias. **Resultados:** Previamente à implantação *in vivo*, a espectroscopia Raman identificou nas vitrocerâmicas estudadas diferentes predominâncias dos polimorfos  $\alpha$ -W,  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP. As vitrocerâmicas W40/TCP60, W60/TCP40 e W80/TCP20 apresentaram melhor aglutinação após hidratação pré-operatória. Em todos os pontos biológicos estudados, não foram observados sinais de rejeição. Aos sete dias, macroscopicamente, observou-se formação tecidual que envolveu os grânulos implantados em todos os grupos do estudo. Ao longo dos períodos analisados, as bandas Raman evidenciaram a formação de matriz orgânica e presença de componentes inorgânicos, com maior similaridade espectral do tecido ósseo para a vitrocerâmica W60/TCP40. **Conclusão:** As vitrocerâmicas apresentaram tolerância *in vivo*, sendo que W60/TCP40 e W80/TCP20 demonstraram modificações composicionais graduais, que indicam desempenho adequado para aplicação como substituto ósseo, com melhor evidência para a vitrocerâmica W60/TCP40. Já a vitrocerâmica W20/TCP80 não apresentou modificações composicionais notórias *in vivo*, evidenciando potencial para utilização como material de preenchimento.

**Palavras-chave:** Biomateriais. Regeneração óssea. Vitrocerâmica. Silicato de cálcio. Fosfato tricálcico.



MONÇÃO, Mauricio Mitsuo. **Evaluation of biological behavior and compositional modifications of glass-ceramics based on wollastonite and tricalcium phosphate for bone regeneration.** 123 s. 2021. Advisor: Roberto Paulo Correira de Araújo. Doctoral (Thesis) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2022.

## ABSTRACT

**Introduction:** Wollastonite (W) and tricalcium phosphate (TCP) minerals have recognized biocompatibility and different behaviors in biological fluids. Glass-ceramics were developed in the form of granules, with different W and TCP weight percentages in order to obtain different solubility, bioactivity and biodegradability behaviors during bone repair in a critical bone defect. **Objective:** To evaluate vibrational and structural properties, as well as *in vivo* biological behavior and compositional modifications of glass-ceramics in the form of granules with different W and TCP weight percentages. **Materials and methods:** 76 male *Wistar* rats were used, which were divided into four experimental groups according to each glass-ceramic type - W20/TCP80, W40/TCP60, W60/TCP40 and W80/TCP20 -, plus a positive control group and a negative control group with untreated bone defect. Samples were macroscopically evaluated and by digital radiography over seven days after implantation, and by Raman spectroscopy at the following biological points: 07, 15, 45 and 120 days. **Results:** Before implantation, Raman spectroscopy identified different predominance of  $\alpha$ -W,  $\beta$ -TCP and  $\alpha$ -TCP polymorphs in glass-ceramics. W40/TCP60, W60/TCP40 and W80/TCP20 showed better agglutination after hydration. In all biological points, no signs of rejection were observed. Along seven days, tissue formation was macroscopically observed, involving implanted granules in all study groups. Over the analyzed periods, Raman bands showed formation of components associated with organic matrix and presence of inorganic components, with greater spectral similarity of bone tissue to the W60/TCP40 glass-ceramic. **Conclusion:** Glass-ceramics showed *in vivo* tolerance, and W60/TCP40 and W80/TCP20 showed gradual compositional changes, which indicate adequate performance for application as bone substitute, with better evidence for the W60/TCP40 glass-ceramic. W20/TCP80 glass-ceramic did not show noticeable *in vivo* compositional changes, showing potential for using as filling material.

**Keywords:** Biomaterials. Bone regeneration. Glass-ceramic. Calcium silicate. Tricalcium phosphate.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA E METODOLOGIA

<b>Figura 1</b>	Representação dos componentes do tecido ósseo.....	21
<b>Figura 2</b>	Características da superfície do biomaterial .....	32
<b>Figura 3</b>	Rede estrutural dos polimorfos (a) $\beta$ -TCP e (b) $\alpha$ -TCP .....	36
<b>Figura 4</b>	Rede estrutural dos polimorfos (a) $\beta$ -W e (b) $\alpha$ -W .....	38
<b>Figura 5</b>	Dissolução inicial da vitrocerâmica W/TCP.....	43
<b>Figura 6</b>	Biodegradação e bioreabsorção gradual da vitrocerâmica W/TCP.....	43
<b>Figura 7</b>	Confecção do defeito ósseo crítico em calvária de rato Wistar.....	46

### ARTIGO 1

<b>Figura 1</b>	Características macroscópicas das vitrocerâmicas W/TCP.....	51
<b>Figura 2</b>	Implantação das vitrocerâmicas.....	52
<b>Figura 3</b>	Aspectos das diferentes proporções de W%/TCP%.....	52
<b>Figura 4</b>	Exemplar de calvária de rato após implantação da vitrocerâmica.....	54
<b>Figura 5</b>	Aspectos macroscópicos das calvárias .....	54
<b>Figura 6</b>	Imagens radiográficas dos grupos experimentais.....	55

### ARTIGO 2

<b>Figura 1</b>	Desenho experimental.....	61
<b>Figura 2</b>	Espectros do grupo W20/TCP80.....	64
<b>Figura 3</b>	Espectros do grupo W60/TCP40.....	65
<b>Figura 4</b>	Espectros do grupo W80/TCP20.....	66
<b>Figura 5</b>	Intensidades espectrais alcançadas pelos grupos experimentais.....	68
<b>Figura 6</b>	Comparativo da FWHM da banda $962\text{ cm}^{-1}$ .....	70

### ARTIGO 3

<b>Figura 1</b>	Vitrocerâmicas à base de W/TCP.....	79
<b>Figura 2</b>	Espectros Raman das vitrocerâmicas .....	80
<b>Figura 3</b>	Espectros com indicação das principais bandas Raman.....	81

## TABELA

**Tabela 1** Principais bandas identificadas nas vitrocerâmicas em estudo ..... **81**

### LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

CaSiO <sub>3</sub>	fórmula química da wollastonita
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	fórmula química do fosfato tricálcico
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	fórmula química da hidroxiapatita
FT-Raman	espectroscopia Raman por Transformada de Fourier
kVp	Quilovolt
mA	Miliampere
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	fórmula química grupo fosfato
SiO <sub>2</sub>	fórmula química do silício
SiO <sub>4</sub>	fórmula química do grupo silicato
TCP	fosfato tricálcico
W	Wollastonite
α-W	alfa wollastonita ou pseudowollastonita
μM	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>15</b>
<b>3 HIPÓTESES</b> .....	<b>16</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	17
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>5 FUNDAMETAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>18</b>
5.1 TECIDO ÓSSEO.....	19
5.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	26
5.3 BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA .....	28
5.4 FOSFATO TRICÁLCICO .....	35
5.5 WOLLASTONITA .....	37
5.6 VITROCERÂMICAS À BASE DE W E TCP .....	40
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
6.1 TIPO DE PESQUISA.....	44
6.2 VITROCERÂMICAS .....	44
6.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	45
6.4 DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO .....	45
<b>7 RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
7.1 ARTIGO 1: <b>Analysis of the behavior of a biomaterial based on wollastonite/TCP in the implant process of an experimental model of critical bone defects</b> .....	49
7.2 ARTIGO 2: <b>Raman spectroscopy analysis of wollastonite/TCP glass-ceramics after implantation in critical bone defect in rats</b> .....	58
7.3 ARTIGO 3: <b>Compositional analysis and structural phases of glass-ceramics developed with different Wollastonite and TCP proportions using Raman spectroscopy</b> .....	76
<b>8 DISCUSSÃO</b> .....	<b>91</b>
<b>9 CONCLUSÃO</b> .....	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>98</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>112</b>
ANEXO A - Comitê de Ética no Uso de Animais .....	112
ANEXO B - Carta de aceite para publicação - artigo 2 .....	113
ANEXO C - Submissão em periódico científico - artigo 3.....	114
ANEXO D - Declaração da produção de capítulo de livro .....	115
ANEXO E - Súmula do capítulo de livro produzido .....	116
ANEXO F - Informações do fabricante .....	117
ANEXO G - Certificados de Análise das Matérias Primas.....	120

## 1 INTRODUÇÃO

As pesquisas com biomateriais sintéticos buscam substitutos ósseos com maiores potenciais para estimular a regeneração óssea, principalmente no tratamento de perda óssea extensa, cuja capacidade autorregenerativa do tecido se mostra limitada<sup>(1,2)</sup>. Para a bioengenharia, o conceito de regeneração óssea pressupõe que a reconstrução tecidual de defeitos ósseos, provocados por traumas, doenças degenerativas e outras causas, ocorra a partir da aplicação de um biomaterial capaz de estimular a formação de novo tecido, com as mesmas características estruturais e funcionais do tecido ósseo nativo<sup>(3)</sup>. Dessa forma, existe grande interesse em alternativas baseadas na utilização de biomateriais sintéticos, que apresentem habilidade de interagir com o organismo receptor, estimulando a osteogênese de acordo com os princípios biológicos da reparação tecidual óssea<sup>(4)</sup>.

Nas últimas décadas, além da variedade de biomateriais sintéticos identificados com finalidade de tratamento das perdas ósseas, o avanço tecnológico na área da bioengenharia possibilitou o desenvolvimento de estratégias, com o propósito de modificar e/ou melhorar as propriedades físico-químicas dos biomateriais sintéticos para regeneração óssea<sup>(4,5)</sup>. Por exemplo, o desenvolvimento de compósitos busca reunir propriedades físico-químicas de dois ou mais biomateriais significativamente diferentes, os quais, quando associados, resultam em melhores desempenhos para bioatividade, biodegradação e biorreabsorção proporcional à regeneração óssea<sup>(6,7)</sup>.

Entre os biomateriais que despertam interesse para regeneração óssea, os minerais wollastonita (W) e fosfato tricálcico (TCP) se destacam devido a suas reconhecidas biocompatibilidades e por suas propriedades físico-químicas favoráveis à regeneração óssea<sup>(8,9,10)</sup>. Ambos os minerais, quando submetidos a diferentes tratamentos térmicos controlados, apresentam modificações estruturais e formação de diferentes polimorfos, podendo assumir diferentes comportamentos em meio biológico<sup>(11,12)</sup>.

Os estudos reportam que a W apresenta alta resistência mecânica e maior bioatividade, quando comparada às biocerâmicas de fosfatos de cálcio<sup>(13,14)</sup>. Sua maior bioatividade ocorre devido à dissolução incongruente em meio biológico, com rápida liberação dos íons de cálcio, lenta liberação dos íons de silício e formação de uma camada de sílica amorfa em sua superfície, favorecendo a precipitação de apatita semelhante à apatita biológica, que contribui para a osteogênese<sup>(14)</sup>. Ademais, os efeitos positivos do silício na angiogênese e na osteogênese são reportados na literatura<sup>(15,16)</sup>.

Já o TCP é amplamente pesquisado devido à sua composição química conter componentes semelhantes às do tecido ósseo e por apresentar dissolução em meio biológico<sup>(17)</sup>. Os polimorfos  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -TCP são biodegradáveis e biorreabsorvíveis pelo organismo quando implantados em sítio ósseo<sup>(18)</sup>. Ambos polimorfos têm habilidade para osteocondução, porém, a maior estabilidade do  $\beta$ -TCP em meio biológico justifica seu amplo emprego na formulação de biocerâmicas que servem como substitutos ósseos<sup>(17,19)</sup>.

Embora a W e o TCP tenham reconhecidas propriedades favoráveis à regeneração óssea, quando usados individualmente apresentam limitações para aplicação como substituto ósseo. Por exemplo, a W é altamente instável meio aquoso e o TCP oferece baixa resistência mecânica<sup>(20,21)</sup>. Estudos demonstram que a associação dos referidos minerais na forma de vitrocerâmicas, ou quando associados a outros biomateriais, resultam em melhor desempenho mecânico e maior bioatividade durante o processo de reparo ósseo<sup>(22, 23)</sup>. Também, visto que ambos os minerais apresentam diferentes comportamentos em meio biológico, o emprego de diferentes proporções percentuais em peso de W e TCP pode ajustar a taxa de dissolução, biodegradação e biorreabsorção *in vivo*, de acordo com a dinâmica de neoformação óssea<sup>(24)</sup>.

Nessa perspectiva, com avaliação na pesquisa, desenvolveram-se vitrocerâmicas a base dos minerais W e TCP em diferentes proporções percentuais em peso. Buscou-se analisar o comportamento biológico, bem como as modificações composicionais *in vivo* das vitrocerâmicas, após implantação em modelo de defeito ósseo crítico em calvária de rato, a fim de obter maior compreensão dos desempenhos ao longo do processo de reparação óssea.

Para tanto, a fim de nortear esta pesquisa, inicialmente apresenta-se uma revisão de literatura sobre a anatomia e fisiologia do tecido ósseo, bem como a dinâmica do seu reparo após lesão. Também, explana-se sobre as principais características físico-químicas necessárias para um substituto ósseo sintético, com especial destaque para as vitrocerâmicas com finalidade de regeneração óssea.

Posteriormente, acrescentam-se três artigos científicos, com resultados de diferentes análises obtidas por meio de técnicas não destrutivas, para maior compreensão do comportamento biológico e das modificações composicionais das vitrocerâmicas no modelo experimental *in vivo*. Ao final, apresenta-se a discussão dos resultados obtidos, seguida da conclusão que sumariza o desempenho das vitrocerâmicas avaliadas no presente estudo.

## 2 JUSTIFICATIVA

A obtenção de biomateriais sintéticos, conformados à dinâmica de reparação óssea, com maiores potenciais para estimular a regeneração tecidual, continua sendo um desafio para a bioengenharia. Embora possuam biocompatibilidade, os biomateriais W e TCP apresentam limitações de natureza química e estrutural quando utilizados individualmente como substituto ósseo. Sendo assim, a associação da W e do TCP na forma de vitrocerâmica pode reunir distintas propriedades físico-químicas, resultando em um biomaterial substituto do tecido ósseo com melhor desempenho para o tratamento de perda óssea.

No entanto, observou-se uma lacuna de conhecimento sobre como diferentes proporções percentuais em peso de W e TCP podem interferir no desempenho da vitrocerâmica durante a reparação óssea e na sua habilidade de estimular a regeneração tecidual, especialmente, em situação de extensa perda óssea. Sabe-se que ambos os minerais apresentam diferentes comportamentos de dissolução, biodegradação e biorreabsorção em meio biológico. Dessa forma, a proposta desta pesquisa foi impulsionada pela relevância da maior compreensão do comportamento biológico e modificações composicionais *in vivo* de vitrocerâmicas, com diferentes proporções percentuais em peso de W e TCP, ao longo do processo de reparo ósseo.

Cabe destacar que estudos com vitrocerâmicas à base de W e TCP, desenvolvidos por pesquisadores do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, realizaram avaliações por meio histomorfológico e histomorfométrico, restringindo-se aos aspectos celulares e teciduais que indicaram potenciais para regeneração óssea. Desse modo, para a presente pesquisa foram empregadas diferentes análises por meio de técnicas não destrutivas, a fim de se obter maior compreensão do comportamento biológico e das modificações composicionais das vitrocerâmicas durante o reparo ósseo. Ademais, as conclusões deste estudo também subsidiarão outras pesquisas com W e TCP para aplicações biomédicas.

### 3 HIPÓTESES

Face ao exposto, são hipóteses de pesquisa do presente estudo:

✓ Diferentes proporções percentuais em peso de W e TCP resultam em distintos comportamentos biológicos que interferem na habilidade da vitrocerâmica de servir como substituto de tecido ósseo.

✓ Diferentes predominâncias de fases minerais determina a habilidade da vitrocerâmica em apresentar modificações composicionais *in vivo*, e de seu potencial para ser empregada como substituto ósseo.

✓ Vitrocerâmicas com diferentes proporções percentuais em peso de W e TCP apresentam diferentes desempenhos para regeneração óssea durante o processo de reparação em defeito ósseo crítico.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades vibracionais e estruturais de vitrocerâmicas, na forma de grânulos, apresentadas com diferentes proporções percentuais em peso de W e TCP, bem como o comportamento biológico e as modificações composicionais *in vivo*, após implantação em modelo de defeito ósseo crítico em calvária de rato *Wistar*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Caracterizar a composição molecular e estrutural de vitrocerâmicas a base de W e TCP nas proporções de W20/TCP80, W40/TCP60, W60/TCP40 e W80/TCP20, por meio da espectroscopia Raman, antes da implantação *in vivo*;

✓ Analisar o comportamento biológico, macroscópico e radiográfico dos biomateriais supracitados, após implantação em defeito ósseo crítico em calvária de rato *Wistar*;

✓ Identificar, por meio da espectroscopia Raman, as modificações composicionais das vitrocerâmicas nos pontos biológicos de 07, 15, 45 e 120 dias.

## 5 FUNDAMETAÇÃO TEÓRICA

Desde a Antiguidade, a humanidade busca meios para solucionar problemas de saúde e melhorar a qualidade de vida. A utilização de materiais naturais ou sintéticos para substituir partes do corpo lesionado, ou mesmo sadio, esteve presente na história entre os diversos povos<sup>(8)</sup>. Ao longo do tempo, diversas alternativas reparadoras com propriedades físico-químicas compatíveis com o organismo humano foram desenvolvidas e/ou aprimoradas, e atualmente, os chamados biomateriais são empregados em diversas aplicações biomédicas regenerativas, corretivas, substitutivas e/ou estéticas<sup>(25)</sup>.

Conforme a literatura científica, biomateriais são substâncias e/ou combinação de substâncias, naturais ou sintéticas (outra que não drogas), utilizadas em aplicações biomédicas<sup>(26)</sup>. O conceito mais amplo descreve um biomaterial como qualquer material biocompatível, que pode ser usado para substituir ou auxiliar na manutenção de parte de um órgão ou tecido, mantendo íntimo contato com o organismo vivo <sup>(25,26)</sup>. Tais biomateriais interagem com sistemas biológicos, resultando em tratamento, aumentando volume ou substituindo tecidos, órgãos ou funções do corpo. Além da recuperação da qualidade de vida, o avanço tecnológico dos biomateriais muitas vezes proporciona a total recuperação estrutural e funcional de tecidos e órgãos<sup>(26,27)</sup>.

Especificamente sobre o tecido ósseo, sabe-se que nas situações de perda extensa, o mecanismo de regeneração é limitado e o reparo ocorre por cicatrização, com formação de tecido fibroso e perda de função<sup>(28,29)</sup>. O enxerto autógeno ainda é considerado o padrão ouro para o tratamento de situação dessa natureza, pois, além de não ser rejeitado pelo organismo, tem as propriedades necessárias para a osteogênese. No entanto, algumas desvantagens devem ser consideradas, como a necessidade de cirurgia para obtenção do enxerto ósseo, tempo necessário para cicatrização do sítio doador, riscos de infecções durante o procedimento, além da quantidade limitada para retirada do tecido na área doadora. Outras opções incluem os enxertos ósseos alógenos, provenientes de banco de tecido humano, e xenógeno, provenientes de outras espécies animais. No entanto, essas alternativas apresentam riscos de rejeição pelo organismo e possibilidade de transmissão de agentes infecciosos<sup>(29)</sup>.

Dessa forma, o uso de biomateriais sintéticos com finalidade de regeneração óssea apresenta-se como uma alternativa promissora<sup>(30)</sup>. A literatura especializada reporta diferentes materiais poliméricos, metálicos e cerâmicos para aplicações ósseas, sendo alguns com potencial para regeneração óssea. Para tal finalidade, o biomaterial sintético deve respeitar os

eventos biológicos que ocorrem durante o reparo tecidual. Também, deve-se considerar a constante remodelação tecidual, sendo que a quantidade óssea total depende do equilíbrio entre a formação do novo tecido e biorreabsorção óssea<sup>(31)</sup>.

## 5.1 TECIDO ÓSSEO

Visto que a presente tese envolve pesquisa com biomateriais para regeneração óssea, entende-se que é fundamental a compreensão dos componentes desse tecido, sua estrutura anatômica, funções fisiológicas e sua dinâmica para formação e manutenção no organismo humano. O tecido mineralizado do esqueleto humano tem propriedades biomecânicas únicas, adaptados para suportar peso, proteger órgãos vitais e proporcionar movimentos do corpo. Também atuam como fonte de minerais essenciais, necessários para diversas funções do organismo<sup>(32)</sup>.

O tecido ósseo caracteriza-se pela grande diferenciação celular, onde distintos tipos de células passam a especializar-se na elaboração de fibras colágenas e na mineralização tecidual, proporcionando características típicas que conferem suas funções no organismo<sup>(32,33)</sup>. Esse tecido é formado por células (osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e por matriz extracelular. As osteoprogenitoras são consideradas células de reserva que podem ser estimuladas, diferenciando-se em osteoblastos. São encontradas no endóstio, perióstio, canais ósseos e em outros tecidos do organismo. Durante a fase de crescimento dos ossos e nas situações que exigem reparações de lesões ósseas, as células osteoprogenitoras são estimuladas e diferenciam-se em osteoblastos<sup>(34)</sup>.

Os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos são as células que se apresentam em constante dinâmica para a produção, manutenção e biorreabsorção da matriz osteiide e óssea, respectivamente. Os osteoblastos têm função de sintetizar a parte orgânica da matriz óssea e sua mineralização. A parte orgânica é formada principalmente por fibras colágenas, proteoglicanos e glicoproteínas, elementos responsáveis pela manutenção de sua vitalidade e plasticidade<sup>(33)</sup>.

A matriz orgânica sintetizada pelos osteoblastos é depositada de forma circunjacente a essas células, a qual posteriormente é mineralizada, formando lacunas e os canalículos. A mineralização é iniciada a partir da secreção de pequenas vesículas pelos osteoblastos, ricas em fosfatase alcalina, dando origem à fase mineral do tecido ósseo, cuja composição principal é a hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Dessa forma, com a produção e aumento da mineralização

do tecido, os osteoblastos ficam aprisionados em lacunas e passam a ser chamados de osteócitos<sup>(35)</sup>.

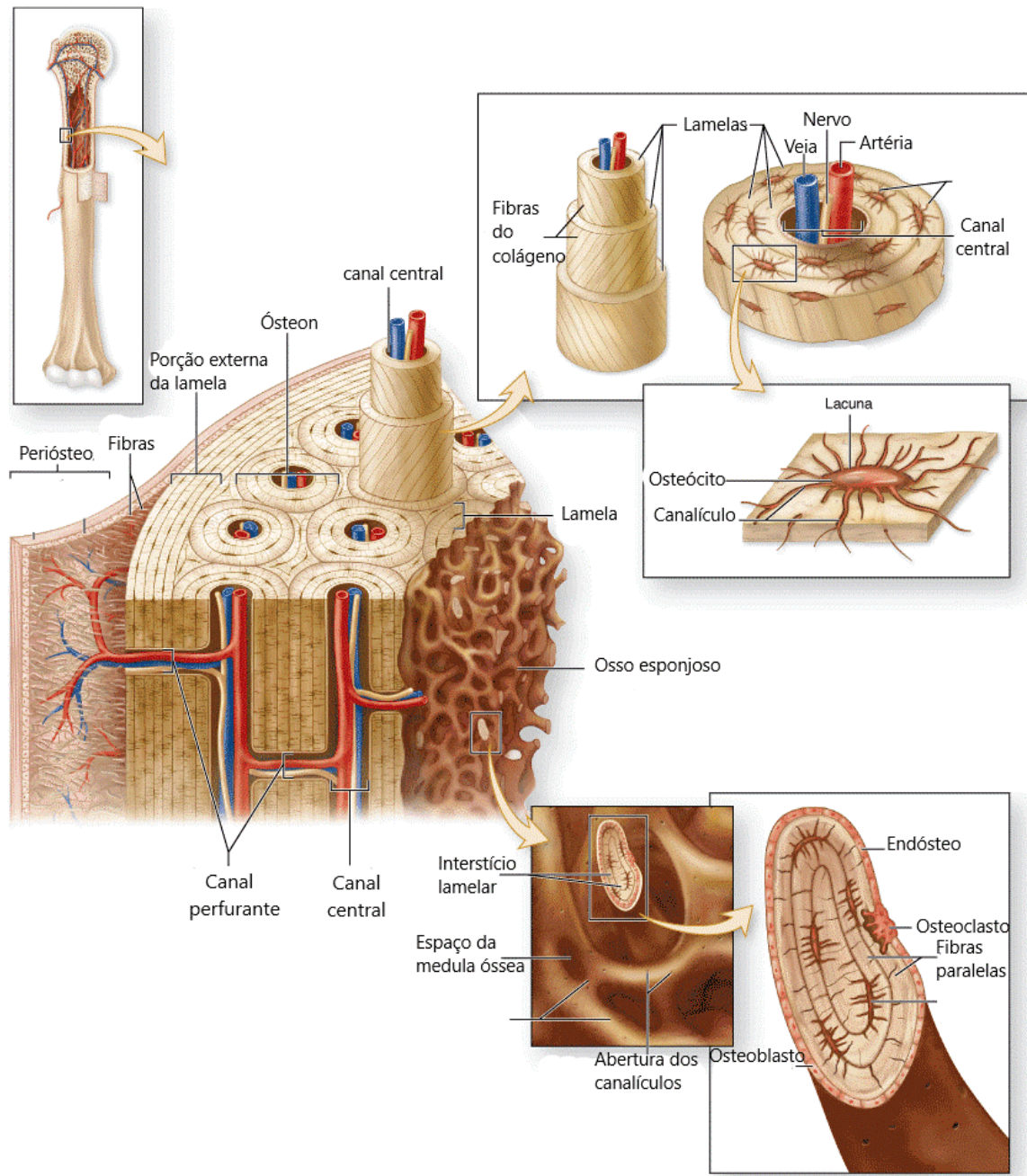
Os osteócitos, células maduras, são responsáveis pela manutenção da matriz óssea. A morte do osteócito promove a biorreabsorção da matriz pela atividade dos osteoclastos, seguida pelo reparo ou remodelação do tecido pelos osteoblastos. Em cada lacuna fica apenas um osteócito e, através de canalículos, mantém comunicação com lacunas adjacentes, onde os prolongamentos citoplasmáticos realizam comunicação com osteócitos vizinhos. Como não ocorre difusão de substâncias na matriz óssea mineralizada, os canalículos possibilitam a dinâmica necessária para a nutrição dos osteócitos, permitindo a passagem de moléculas entre capilares sanguíneos e os osteócitos<sup>(34,35)</sup>.

No tecido ósseo, há uma contínua formação e reabsorção tecidual, conhecidas como *turn over* ósseo. Para haver equilíbrio e manutenção das condições estruturais do tecido ósseo, é necessário que uma célula realize a biorreabsorção da referida matriz, o osteoclasto. Trata-se de um tipo celular que produz e secreta um conjunto de enzimas, moléculas de adesão e mecanismos de reconhecimento, que proporcionam o equilíbrio entre a produção e a biorreabsorção de matriz óssea<sup>(36)</sup>.

Os osteoclastos são células grandes, móveis, multinucleadas e com ramificações irregulares. Contêm grande quantidade de lisossomos para liberação do conteúdo enzimático nos espaços entre os prolongamentos citoplasmáticos. Quando ativos, encontram-se sobre a superfície óssea a ser reabsorvida. No sítio de adesão, ocorre a secreção de colagenase e de enzimas, que digerem os componentes orgânicos da matriz óssea e dissolvem a matriz inorgânica para liberar íons de fosfato e de cálcio. A calcitonina e o paratormônio controlam a atividade dos osteoclastos de forma antagônica, sendo que o paratormônio estimula e a calcitonina reduz a biorreabsorção óssea<sup>(33,36)</sup>.

Dessa forma, um complexo mecanismo envolvendo diferentes tipos celulares ósseos mantém a dinâmica da sua matriz com constituintes orgânico e inorgânico. A parte orgânica é formada principalmente por colágeno do tipo I e poucas quantidades de proteoglicanos e glicoproteínas. Já a parte inorgânica tem como principais constituintes o cálcio e o fosfato, que formam os cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) ao longo das fibras colágenas, e pequenas quantidades de bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citratos<sup>(32,33)</sup>.

**Figura 1:** Representação dos componentes do tecido ósseo e organização estrutural.



**Fonte:** Adaptado de Mescher (2016)<sup>(33)</sup>.

A matriz óssea recém produzida não mineralizada é chamada de osteoide. Dentro da normalidade, íons de cálcio e fosfatos formam cristais de hidroxiapatita e se ligam às fibras de colágeno, promovendo a mineralização característica do osso. A hidroxiapatita óssea é considerada não estequiométrica, por ser deficiente em cálcio e por conter átomos de outros minerais e carbonatos<sup>(37)</sup>.

A mineralização da matriz extracelular óssea é um processo dinâmico, controlado por múltiplas vias de regulação genética e por estímulos mecânicos que regulam a homeostase dos íons de cálcio e de fosfato. Por muito tempo, a fase mineral óssea foi descrita como hidroxiapatita, similar à apatita geológica, devido à sua composição química e ao padrão de cristalinidade. Atualmente, sabe-se que a composição mineral óssea não é uniforme e que, ao longo do tempo, os minerais inicialmente depositados na matriz extracelular passam por transição de fase, dando origem ao tecido ósseo maduro, composto por cristais nanométricos<sup>(38)</sup>.

Durante o desenvolvimento dos embriões humanos, os centros primários de ossificação dos ossos endocondrais surgem entre 8 e 12 semanas de gestação, porém, a mineralização dos tecidos esqueléticos não ocorre até o terceiro trimestre<sup>(39)</sup>. A mineralização da matriz extracelular nos ossos endocondrais inicia-se sobre uma estrutura de cartilagem hialina, que apresenta formato semelhante aos ossos que irão se formar, curtos ou longos. Já nos ossos com mineralização intramembranosa, o processo ocorre no interior de membranas de tecido mesenquimal durante a vida intrauterina e de membranas de tecido conjuntivo, na vida após nascimento<sup>(40)</sup>.

A disponibilidade sistêmica dos íons de cálcio e de fosfato no organismo implica diretamente na qualidade e na manutenção da estrutura mineral óssea. De fato, a redução nos níveis sistêmicos desses minerais resulta em osteomalácia, com aumento característico de tecido osteoide não mineralizado. Os íons de cálcio e de fosfato são obtidos por meio da alimentação, absorvidos pelo organismo e distribuídos por meio da circulação sistêmica aos órgãos e tecidos<sup>(41)</sup>. A maioria dos tecidos corporais (tecidos moles) apresenta inibidores da precipitação de cristais hidroxiapatita, como o pirofosfato. Dessa forma, em condições fisiológicas, esses tecidos não se mineralizam, mesmo com altas concentrações de cálcio e fosfato circulantes no meio extracelular<sup>(42)</sup>.

O metabolismo dos íons cálcio e de fosfato apresentam constante movimentação desses dois íons para dentro e para fora do organismo, regulando suas concentrações nos vários compartimentos do corpo. Após serem absorvidos da alimentação, as concentrações de cálcio e de fosfato são aumentadas na circulação sanguínea, favorecendo a precipitação dos cristais de hidroxiapatita no tecido ósseo. Quando diminui a concentração do íon cálcio na circulação, o cálcio presente no tecido ósseo é mobilizado para a circulação sistêmica<sup>(43)</sup>.

Dois mecanismos de mobilização do cálcio depositado no tecido ósseo são descritos, sendo o primeiro a simples transferência dos íons dos cristais de hidroxiapatita para o líquido

intersticial e o segundo, o mecanismo envolvendo ação do paratormônio, sobre o tecido ósseo, causando aumento no número de osteoclastos e biorreabsorção da matriz óssea, com consequente liberação de cálcio e de fosfato para a circulação sistêmica<sup>(44)</sup>. O paratormônio atua sobre receptores localizados nos osteoblastos, que deixam de sintetizar colágeno e iniciam a secreção do fator estimulador de osteoclastos. Ocorrendo o equilíbrio da concentração de cálcio na circulação, o hormônio calcitonina, produzido pelas células parafoliculares da tireoide, inibe a ação dos osteoclastos e a biorreabsorção da matriz, interrompendo a retirada dos íons minerais do tecido ósseo. Cabe ressaltar que a concentração de fosfato não aumenta na circulação, pois o paratormônio acelera sua excreção por meio do sistema renal<sup>(44)</sup>.

Conforme já destacado, os cristais de hidroxiapatita se desenvolvem com a precipitação dos íons de cálcio e de fosfato sobre a matriz osteoide, composta principalmente de colágeno tipo I. Assim, basicamente, a mineralização óssea é definida como o processo de deposição de fosfato de cálcio na matriz óssea. O osso humano é constituído de 60 a 70% de minerais, que incluem fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita, e de 20 a 40% de matriz orgânica, contendo fibras de colágeno tipo I, com poucas quantidades de água e lipídios (<5%). Durante o processo de mineralização óssea, os osteoblastos, também conhecidos como células formadoras de osso, auxiliam na formação de cristais de fosfato de cálcio, na forma de hidroxiapatita, que são alinhados na matriz colagênica. A parte mineral óssea é interligada com o colágeno de forma organizada, fato que fornece flexibilidade e permeabilidade à estrutura, assim como rigidez característica<sup>(32)</sup>.

Essa organização do tecido ósseo se comporta como um composto que atua para proteção da hidroxiapatita, a qual, isoladamente, é considerada um material frágil de baixa resistência ao impacto, transferindo forças ao redor da ligação inorgânica-orgânica, reduzindo assim a formação de tensão na matriz óssea. Também tal arranjo proporciona condições às diversas funções desempenhadas pelo tecido ósseo, por exemplo: durante o crescimento corpóreo do organismo; nas situações de reparação em caso de fratura óssea; na rápida formação óssea após estímulos; na dinâmica de formação e biorreabsorção constante da matriz óssea, a fim de se ajustar às necessidades mecânicas e de reserva de minerais, evitando danos à sua estrutura<sup>(35)</sup>.

O osso pode ser dividido em osso cortical e osso trabecular, a depender dos seus aspectos mecânicos e biológicos. O osso cortical é responsável pela maior parte do esqueleto (cerca de 80%), correspondendo à porção mais compacta e densa do osso, que reveste todos os ossos do organismo. É formado por séries de estruturas que estão muito próximas, chamadas ósteons<sup>(46)</sup>.

Os ósteons são formados por lamelas ósseas dispostas concentricamente em torno do canal Havers, que contém vascularização sanguínea e tecido conjuntivo. Já o osso trabecular constitui cerca de 20% do esqueleto e é encontrado na porção interior dos ossos, sendo mais proeminente no esqueleto axial e em porções proximais do rádio e do fêmur. O osso trabecular é metabolicamente mais ativo que o cortical, devido à sua superfície com número maior de células por unidade de volume. Sua organização proporciona uma relação superfície/volume consideravelmente maior do que a do osso cortical, que disponibiliza cerca de 80% da superfície onde ocorre a remodelação. É formado por uma rede de trabéculas interconectadas, a qual confere maior resistência à compressão<sup>(33,46)</sup>.

No tecido ósseo, as moléculas livres de água desempenham um papel fundamental, pois são redistribuídas durante o suporte de carga do osso. Assim, no processo de mineralização óssea, quando a quantidade de água diminui, a mineralização do osso começa a ocorrer e vice-versa. A característica de rigidez do tecido ósseo está diretamente relacionada à sua mineralização, ou seja, o osso tende a ficar mais rígido por conter maiores quantidades de minerais e menor quantidade de água<sup>(47)</sup>.

As fibras de colágeno na estrutura do osso são distribuídas num arranjo planar, as lamelas, as quais, após mineralizadas formam camadas concêntricas (3-8 lamelas) ao redor de um ósteon. Cada molécula de colágeno existe como uma estrutura helicoidal tripla formada por duas cadeias de  $\alpha$ -1 e uma cadeia de  $\alpha$ -2. A cadeia individual tem cerca de mil aminoácidos no sentido do comprimento e a parte central da hélice contém tripletos de gly-X-Y em sequência repetida, onde geralmente o X é uma prolina e o Y é uma hidroxiprolina. As moléculas de glicina auxiliam na formação da estrutura helicoidal do colágeno e, basicamente, todos os aminoácidos são incorporados ao colágeno. A manutenção da rigidez helicoidal da cadeia se deve aos resíduos de prolina e hidroxiprolina. A parte hidroxila do aminoácido hidroxiprolina é importante para a interação com as moléculas de água por meio de ligações de hidrogênio<sup>(33,48)</sup>.

A porção óssea mineralizada é composta por um tipo de apatita carbonatada (hidroxiapatita), com estrutura policristalina. A formação da hidroxiapatita ocorre com a nucleação no espaço entre as extremidades das fibrilas de colágeno e se espalha longitudinalmente. Inicialmente, a fase mineral é depositada na forma de fosfato de cálcio amorfo, o qual pode ser precipitado em soluções aquosas supersaturadas, contendo íons de



cálcio e fósforo, a pH elevado e temperatura ambiente. Depois de precipitado, o fosfato de cálcio amorfo se converte em fosfato octacálcico ou hidroxiapatita<sup>(49)</sup>.

A hidroxiapatita biológica é estável em ambiente fisiológico e se diferencia da obtida por métodos sintéticos por sua maior cristalinidade e presença de substituições iônicas em sua estrutura, pois acomoda facilmente uma grande variedade de substituições catiônicas e aniônicas na sua estrutura<sup>(50,51)</sup>. Por exemplo, a incorporação de íons carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) provoca mudanças na morfologia, nos parâmetros de rede, no tamanho do cristal e na maior solubilidade dos cristais da apatita. Chama-se hidroxiapatita carbonatada do tipo A a apatita cujo íon carbonato substitui o íon hidroxila ( $\text{OH}^-$ ); e hidroxiapatita carbonatada do tipo B a apatita cujo íon carbonato substitui o íon fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). As apatitas carbonatadas do tipo A são encontradas tipicamente em osso velho, enquanto a do tipo B é mais abundante no osso jovem<sup>(52)</sup>.

Com a maturação óssea, a quantidade de fases de cálcio carbonatado (cálcio hidratado) diminui e os cristais de hidroxiapatita dão origem a uma estrutura em forma de disco, crescendo lateralmente, enquanto se alinham paralelamente às fibrilas de colágeno. No decorrer do processo, o disco mineral se funde com outros cristais para formar uma grande estrutura policristalina, que se torna realmente maior do que a espessura das fibrilas. Os cristais de hidroxiapatita aumentam de tamanho durante o envelhecimento ósseo devido às mudanças no conteúdo de íons da composição mineral. Dessa forma, a idade do tecido ósseo é diretamente proporcional ao tamanho dos cristais<sup>(53)</sup>.

Durante a mineralização óssea, os cristais do mineral se acumulam de forma sistemática sobre a matriz extracelular, onde as células rodeadas de matriz mineral preparam um padrão de acúmulo mineral, fixando as dimensões finais dos cristais. Atualmente, dois modelos importantes têm sido considerados para explicar o processo de mineralização óssea, sendo que um envolve mineralização com a ajuda do molde de colágeno; e o outro, incluiu as vesículas de matriz formadas a partir da membrana citoplasmática dos osteoblastos<sup>(47)</sup>.

No modelo que considera o molde de colágeno para fins de mineralização, o acúmulo de mineral se deve principalmente às proteínas não colágenas ácidas, que desempenham papéis importantes na mediação da mineralização do colágeno, pois são associadas à inibição da cristalização de solução, contendo íons de cálcio e fosfato, além de favorecerem a deposição desses minerais no espaço interfibrilar do colágeno<sup>(54)</sup>. Por exemplo, o poliaspartato tem sido amplamente utilizado em modelos *in vitro* para produzir colágeno mineralizado biomimético, pois demonstra comportamento capaz de nuclear hidroxiapatita que induz à deposição mineral

intrafibrilar alinhada. Basicamente, a matriz colágena dá um padrão ordenado de deposição do mineral, participando diretamente da mineralização ao se comportar como um nucleador<sup>(55)</sup>.

No modelo de mineralização óssea a partir de vesícula de matriz, considera-se que os osteoblastos, depois de secretarem a camada primária de matriz orgânica, dão origem a novas vesículas na membrana citoplasmática, cercados de membrana lipídica, com tamanho variado. Inicialmente, ocorre a formação de cristais primários de hidroxiapatita dentro da vesícula de matriz e, após seu rompimento, ocorre a liberação da hidroxiapatita já formada no fluido extracelular, rico em íons de cálcio e fosfato, que favorece o crescimento de novos cristais de hidroxiapatita, naqueles já formados, com deposição do mineral na superfície das fibrilas de colágeno<sup>(56)</sup>.

Esse constante mecanismo de formação e biorreabsorção óssea faz com que o tecido ósseo seja extremamente ativo durante toda vida do organismo. No esqueleto humano em desenvolvimento, essa atividade é voltada principalmente para o crescimento e a modelação óssea, levando os ossos a alcançarem formas e tamanhos característicos. No indivíduo adulto, além de proporcionar a remodelação, essa constante atividade metabólica garante a renovação do esqueleto e condições para integridade estrutural<sup>(57)</sup>.

Essa dinâmica óssea também favorece sua capacidade de regeneração tecidual em muitas situações, sendo capaz de restabelecer completamente sua função e sua estrutura arquitetônica. Sabe-se que o tecido ósseo é um dos poucos tecidos do corpo humano com capacidade de reparação sem a formação de cicatriz fibrosa. O processo de reparação espontânea leva à restauração da continuidade do tecido em locais que sofreram lesões, mantendo seu volume adequado e a arquitetura do local<sup>(58)</sup>. No entanto, quando uma lesão apresenta extensa perda óssea, o mecanismo natural de reparação ocorre de forma limitada, sendo que o processo de cicatrização é finalizado por fibrose, sem reestabelecimento das funções e estrutura arquitetônica<sup>(59)</sup>.

## 5.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA

A habilidade do organismo em substituir células lesionadas ou mortas e reparar tecidos permite recuperação e sobrevivência. A proliferação celular em tecidos lábeis ocorre por meio da divisão celular contínua, os quais substituem células mortas e promovem a formação do novo tecido. Trata-se de tecidos constituídos de células derivadas de células tronco e que dispõem de

capacidade ilimitada para multiplicar-se. Essas células têm divisão contínua, estão continuamente em replicação e apresentam alto potencial regenerativo<sup>(33,34)</sup>.

Já os tecidos estáveis, normalmente, apresentam baixo nível de multiplicação celular. No entanto, quando sofrem lesões, as células desses tecidos podem ser submetidas à rápida divisão em resposta aos estímulos e, desta forma, são capazes de reconstituir o tecido de origem. O tecido ósseo é um exemplo de tecido estável e, quando sofre lesão, o mecanismo de reparação tecidual é capaz de promover a regeneração tecidual local, com características e função idênticas ao que existia anteriormente. Desta forma, o mecanismo de regeneração promove o reestabelecimento completo do tecido lesionado<sup>(33)</sup>.

Na regeneração óssea, desde o momento em que ocorre a lesão até a remodelação final, uma série de eventos celulares devem ocorrer, como, migração, diferenciação, proliferação celular e síntese da matriz extracelular orgânica e inorgânica<sup>(60,61)</sup>. Após a ocorrência de uma lesão traumática, seguem-se três fases reparativas<sup>(62,63)</sup>:

- 1<sup>a</sup>) Fase inflamatória: Inicia-se com rompimento dos vasos e consequente hemorragia, a partir das extremidades do osso lesionado e tecido mole adjacente. A hemostasia é obtida com início da cascata de coagulação, quando grânulos são liberados das plaquetas que contêm fator de crescimento que atraem neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o local da lesão. Forma-se o coágulo, composto por colágeno, plaquetas e trombina, que servem de reservatório proteico para síntese de citocinas e fatores de crescimento, potencializando seus efeitos. Os neutrófilos apresentam maior concentração 24 horas após a lesão, sendo importantes na liberação de substâncias que auxiliam na destruição das bactérias. Os neutrófilos são gradativamente substituídos pelos macrófagos após 48 - 96 horas da lesão. Os macrófagos têm atividade importante para o término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos, além de contribuir com secreção de citocinas, secreção de fatores de crescimento e na angiogênese. Durante a fase inflamatória, os sinais de rubor, calor, edema e dor são resultado da resposta celular e da bioquímica no local da lesão, devido ao recrutamento celular e aumento da permeabilidade vascular. Tanto as plaquetas desgranuladas como as células inflamatórias liberam substâncias que estimulam as células osteoprogenitoras a se diferenciarem.
- 2<sup>a</sup>) Fase reparativa: Ocorre uma reorganização celular intensa, com proliferação de osteoblastos a partir do periósteo e endósteo próximos a lesão, que penetram no

coágulo e levam à formação do calo fibroso. Esta fase dura em média de duas a quatro semanas. O processo de ossificação intramembranosa leva à formação de osso imaturo (calo ósseo).

3<sup>a</sup>) Fase remodeladora: É iniciada pela ação dos osteoblastos e, então, o calo ósseo passa por uma série de formação e biorreabsorção da matriz óssea, convertendo o tecido recém-formado em osso lamelar e removendo o excesso de material do calo ósseo por ação dos osteoclastos. Nessa fase, que pode durar meses, são restauradas as funções mecânicas e biológicas no local da perda óssea.

A regeneração e a remodelação óssea são mecanismos coexistentes e altamente dinâmicos, controlados por complexos mecanismos celulares e bioquímicos. Nas situações de extensa perda óssea, o mecanismo de regeneração tecidual é limitado, desse modo, ocorre a cicatrização com deposição de tecido fibroso no local da perda óssea, sem restauração das funções biológicas e estruturais típicas do tecido ósseo<sup>(62,63)</sup>.

### 5.3 BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Traumas, tumores e doenças osteodegenerativas são exemplos de mecanismos que podem provocar extensas perdas ósseas, cujo organismo ficará limitado para o reestabelecimento tecidual<sup>(64)</sup>. Nesta situação, a reparação por regeneração óssea só será possível a partir da aplicação de um biomaterial que favoreça a formação de novo tecido, com as mesmas propriedades de sustentação, proteção e função<sup>(65)</sup>.

Sendo assim, existe grande interesse em biomateriais sintéticos que podem ser aplicados como substitutos ósseo, capazes de interagir com o organismo receptor e proporcionar o reestabelecimento das funções estruturais e fisiológicas características do tecido ósseo, especialmente nas situações de extensas perdas<sup>(66)</sup>. Diversos biomateriais são pesquisados e empregados a fim de proporcionar condições físico-químicas que favoreçam a ocorrência da regeneração óssea. A literatura apresenta diferentes materiais do tipo poliméricos, metálicos e cerâmicos que apresentam reconhecidos potenciais para regeneração óssea<sup>(67)</sup>.

A recente revisão da literatura de Girón e colaboradores (2021)<sup>(4)</sup> apresentou uma visão geral dos atuais biomateriais propostos para regeneração óssea. Os autores destacaram que, entre os biomateriais poliméricos, o colágeno foi o mais citado na literatura, seguido de gelatina, quitosana, poli(ácido lático-co-ácido glicólico), policaprolactona, alginatos, ácido hialurônico e polivinil. Já entre as biocerâmicas, a hidroxiapatita se mostrou como a mais citada na

literatura, seguida de fosfato de cálcio e vidros. Independentemente do tipo, um biomaterial com finalidade de regeneração óssea deve ser constituído por elementos químicos que favoreçam a osteogênese. Por exemplo, a capacidade do silício em favorecer a angiogênese e osteogênese é amplamente reportada na literatura<sup>(69)</sup>. Assim sendo, biomateriais que incluem silicatos em suas composições demonstram maiores potenciais para osteogênese<sup>(70)</sup>.

Um biomaterial com finalidade de regeneração óssea também deve dispor de características físicas que favoreçam a interação com o organismo receptor, tais como forma, dimensões, resistência mecânica, porosidade, molhabilidade, carga elétrica, entre outras, e que possibilitem a interação do organismo com a interface do biomaterial<sup>(71)</sup>. Neste sentido, diferentes técnicas de processamento possibilitam o desenvolvimento de biomateriais em diversas formas, como grânulos, massas, cimentos, outros<sup>(72)</sup>. Nota-se um especial interesse nas tecnologias que possibilitam a obtenção de *scaffolds*, que imitam a estrutura tridimensional porosa do osso natural, e na impressão 3D, que possibilita a obtenção de biomateriais com geometria personalizada ao local de interesse para aplicação<sup>(73)</sup>.

Para os biomateriais cerâmicos, o formato de grânulos com tamanhos micrométricos permite a adaptação a qualquer morfologia no sítio ósseo. Embora a literatura não apresente um consenso para o tamanho ideal dos grânulos cerâmicos para fins de regeneração óssea, entende-se que o formato e suas dimensões devem proporcionar o preenchimento do local receptor e respeitar as dimensões do tecido ósseo normal. Referente ao tamanho dos grânulos, estudos demonstraram que grânulos à base de fosfato de cálcio e silicato, com tamanhos entre 250 e 500  $\mu\text{m}$ , promoveram maior vascularização e formação óssea mais significativa do que grânulos com maiores ou menores dimensões<sup>(74,75)</sup>.

Outros aspectos determinantes para o sucesso de um biomaterial incluem suas propriedades mecânicas, topográficas e físico-químicas. As propriedades mecânicas dos biomateriais devem ser adequadas à função que desempenharão no organismo receptor, oferecendo resistência mecânica similar à do tecido normal nativo<sup>(76)</sup>. Esta propriedade é de grande importância uma vez que o biomaterial tem de apresentar integridade mecânica suficiente para garantir o processo de reparação do tecido lesado. Para fins dessa regeneração, a resistência mecânica é imprescindível para a formação da matriz óssea, fornecendo suporte para a carga local, ao tempo em que deve apresentar porosidade suficiente para a adesão e a proliferação celular. Os biomateriais com finalidade de regeneração óssea devem suportar

formação do novo tecido, capaz de suportar cargas e tensões, assegurando a integridade estrutural no local do implante<sup>(77)</sup>.

Muitos materiais biocompatíveis dispõem de boas propriedades mecânicas, contudo, apresentam pouca porosidade, o que reduz o potencial de regeneração óssea por não proporcionar ambiente favorável à proliferação celular e vascularização adequada<sup>(78)</sup>. É necessário existir um equilíbrio entre as propriedades mecânicas e a porosidade. Seguindo os princípios da engenharia tecidual, a porosidade se tornou uma característica determinante no desenvolvimento de novos biomateriais para regeneração óssea. Os estudos evidenciam que o sucesso clínico de uma biocerâmica está relacionado com sua taxa de dissolução, biodegradação e biorreabsorção, bem como como a promoção e/ou favorecimento da angiogênese local e colonização celular, que dependem das suas propriedades químicas e características físicas, que incluem a quantidade, o tamanho e a forma dos seus poros<sup>(79)</sup>. Assim, embora a porosidade possa representar uma limitação para o uso das biocerâmicas nas aplicações que necessitam suporte de alta carga, é vital para as interações necessárias entre o material e o meio biológico, aumentando a capacidade de biorreabsorção, de bioatividade e tamanho da área superficial disponível.

A literatura frequentemente apresenta três classificações para o tamanho dos poros nos biomateriais, com fins de regeneração óssea, sendo, macroporos (poros > 100 µm), microporos (faixa de 0,1 µm a 10 µm) e nanoporos (<0,1 µm). A macroporosidade em um biomaterial para regeneração óssea deve ser capaz de guiar e servir de suporte para a colonização e o crescimento celular dentro do material, de modo que a angiogênese e a formação óssea possam ocorrer simultaneamente com a dissolução, a biodegradação e a biorreabsorção progressiva do arcabouço<sup>(80)</sup>.

Nos biomateriais desenvolvidos no formato de grânulos, o espaço intergranular também se caracteriza como uma rede macroporosa, por fornecer poros por meio da descontinuidade mecânica no material. Monção e Rosa (2019)<sup>(81)</sup> identificaram modificações físicas no formato, nas dimensões e na porosidade de um biomaterial composto de W e TCP, na forma de grânulos micrométricos, após implantação em defeitos ósseos críticos em calvária de rato. Concluíram que o aumento na área ocupada pelos poros intragranulares ocorreu de modo progressivo, simultaneamente com a formação de componentes orgânicos na superfície do implante, demonstrando características favoráveis para a regeneração óssea. De fato, a biodegradação e a biorreabsorção do biomaterial permitem a invasão e a multiplicação celular dentro dos grânulos

do material, propiciando a regeneração óssea. Neste aspecto, a porosidade é determinante para uma resposta biológica favorável, por influenciar na adsorção de proteínas, na adesão celular e na permeabilidade dos fluidos fisiológicos no interior do biomaterial<sup>(82, 83)</sup>.

Considerando a complexidade do processo de regeneração óssea, os biomateriais devem promover diretamente a regeneração tecidual por meio de adesão, proliferação e diferenciação celular aprimorada, criando ligações químicas com os tecidos circundantes. Dessa forma, sua superfície deve promover interações na interface hospedeiro/biomaterial, que são determinadas pelos elementos químicos, morfologia, carga elétrica e molhabilidade, características que proporcionam ambiente para respostas mais favoráveis à regeneração óssea<sup>(84,85)</sup>.

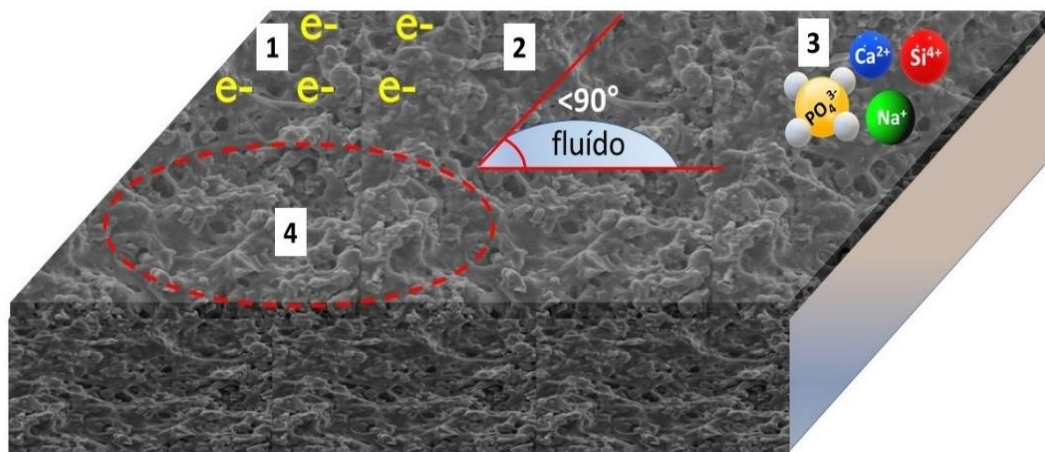
A molhabilidade é medida pela medição do ângulo de contato, geralmente de água, na interface sólido/líquido, enquanto rodeada por uma fase gasosa ou outra fase líquida, e fornece a caracterização da superfície bruta. Um ângulo de contato baixo de menos de 90° indica uma superfície hidrofílica; o líquido se espalhará subsequentemente pela superfície. Um grande ângulo de contato de mais de 90° significa que a superfície é hidrofóbica, levando à formação de gotículas de líquido na interface<sup>(86)</sup>. Sabe-se que a energia superficial também determina a molhabilidade da superfície de um biomaterial. Dessa forma, o aumento das cargas elétricas na superfície de biocerâmicas resulta em melhor desempenho de molhabilidade superficial e melhor desempenho para osteogênese<sup>(87)</sup>.

Conforme já destacado, a energia livre da superfície do biomaterial estabelece um maior grau de molhabilidade e, conseqüentemente, maior afinidade para adsorção de átomos e moléculas. Tal fato se deve a maiores reações entre a superfície do biomaterial e os componentes do meio fisiológico. Também, a molhabilidade está diretamente relacionada com a energia de superfície, portanto, influencia diretamente o grau de contato entre a superfície do biomaterial e o meio fisiológico<sup>(88)</sup>. A rugosidade da superfície também é importante em termos de molhabilidade, aumentando sua ocorrência. Um biomaterial, mesmo que disponha de componentes químicos hidrofílicos, caso seja desenvolvido com a superfície lisa, apresentará menor molhabilidade. Por isso, uma superfície rugosa tornará o biomaterial ainda mais hidrofílico<sup>(89)</sup>.

Podem-se considerar outros aspectos importantes sobre a superfície rugosa em um biomaterial. O atrito entre a superfície rugosa e os componentes biológicos no local de implante resulta em maior retenção inicial, conferindo maior estabilidade primária após o ato cirúrgico<sup>(90)</sup>. Também, considera-se que a superfície rugosa provoca maior atração e adesão

celular quando em contato direto com o coágulo e as células do sangue, por apresentar uma adesão de proteínas sanguíneas<sup>(89)</sup>. Após a formação do coágulo sanguíneo, as células osteogênicas e os osteoblastos são atraídos para a região, interagindo com a superfície do biomaterial, formando tecido ósseo. Cabe ressaltar que o tamanho da rugosidade superficial do biomaterial deve ser proporcional ao tamanho das células, pois caso sejam muito menores ou muito maiores não haverá locais adequados para a adesão celular no material<sup>(91)</sup>.

**Figura 2:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) modificada representando características da superfície de um biomaterial com finalidade de regeneração óssea, determinantes para interação com o organismo receptor.



Legenda: 1) Energia livre; 2) Molhabilidade/Ângulo de contato com líquido; 3) Elementos químicos da composição; 4) Rugosidade e porosidade.

Fonte: Elaboração dos autores.

Obviamente, o requisito essencial para qualquer biomaterial é conter propriedades físico-químicas biocompatíveis com o organismo humano. A biocompatibilidade de um material promove resposta adequada do hospedeiro com uma finalidade<sup>(92)</sup>. Deve apresentar habilidade para integrar-se aos tecidos do organismo receptor, sem risco de rejeição<sup>(93)</sup>.

Além da biocompatibilidade, os biomateriais com finalidade de regeneração óssea devem ter outros requisitos que promovam sua interação com o meio receptor, de forma que a sua atuação em relação às células ósseas promova a osteogênese, ao mesmo tempo que sirva de arcabouço para a migração e a adesão das células ósseas<sup>(94)</sup>. A osteogênese proporciona estímulo, recrutamento, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos. Desse modo, locais que apresentam ausência ou escassez de células ósseas podem



ter o reestabelecimento e o aumento da população de osteoblastos, obtendo maior rapidez no processo de formação de novo tecido ósseo<sup>(95)</sup>.

A propriedade de osteocondução confere ao biomaterial a habilidade de servir de suporte para migração e adesão celular, atuando como arcabouço que mantém condições para a infiltração de células osteoprogenitoras e osteoblastos<sup>(68)</sup>. No decorrer do processo de regeneração óssea, o biomaterial deve ser biorreabsorvido e substituído pelo tecido recém-formado. Também, destaca-se que um biomaterial osteocondutor deve ter estrutura e porosidade semelhantes ao trabeculado do osso humano, a fim de permitir a circulação de fluidos e a angiogênese<sup>(96)</sup>.

Dessa forma, quando implantados em leito ósseo, um biomaterial sintético desenvolvido com finalidade de regeneração óssea deve iniciar uma íntima interação com fluidos e tecidos e se comportar como biorreabsorvível. Os biomateriais biorreabsorvíveis são aqueles que, após certo período em contato com os fluidos e tecidos, entram em biodegradação e acabam solubilizados ou fagocitados pelo organismo<sup>(68)</sup>.

Com base em Holzapfel e colaboradores (2013)<sup>(97)</sup>, destaca-se que os biomateriais inertes entram em contato direto com tecidos e fluidos biológicos e não promovem nenhuma reação química. Não se observa, em quantidade detectável, possíveis componentes resultantes desse processo. Já os biomateriais bioativos correspondem a tipos que interagem com o organismo receptor e ao serem degradados/solubilizados liberam íons importantes para estímulos e desenvolvimento tecidual. Tais biomateriais estabelecem ligações diretas com tecido(s) adjacente(s) e estimulam a proliferação de células, a síntese de fatores específicos e a adesão celular.

Dessa forma, os biomateriais para regeneração óssea necessitam apresentar afinidade celular apropriada, bem como ser biodegradáveis após sua implantação. A biodegradação de um biomaterial pode iniciar-se por hidrólise, mas na medida em que ocorrem modificações estruturais a área superficial e a acessibilidade para as células aumentam, o que favorece a biodegradação enzimática<sup>(98)</sup>.

Sheikh e colaboradores (2015)<sup>(64)</sup> apresentam a biodegradação como um processo que envolve os seguintes fatos:

- I) O material se divide em componentes mais simples, reduzindo a complexidade dos compostos químicos pela ação de sistemas biológicos. Essa biodegradação é regulada pela ação hidrolítica, enzimática e pelo mecanismo celular;

- II) Colapso físico do biomaterial, cuja dissolução passiva de íons e/ou desintegração/fragmentação de partículas leva à perda da sua integridade mecânica;
- III) Erosão química ocasionada pelas alterações químicas do ambiente em torno do biomaterial implantado, onde elevação ou diminuição do pH pode potencialmente causar erosão.

Um material biodegradável, quando implantado em sítio ósseo, entra em contato direto com os fluidos e os tecidos do organismo. Os fluidos se difundem para o interior do material, à medida que ocorre o processo de biodegradação. O meio onde se encontra o implante passa a receber os produtos originados na biodegradação e, por isso, estes devem ser biocompatíveis. Esses produtos poderão dissolver-se nos fluidos extracelulares e servir de estímulo aos mecanismos fisiológicos<sup>(99)</sup>.

A biodegradação dos biomateriais deve ocorrer em equilíbrio com a formação do novo tecido. A biodegradação deve permitir a formação de espaço onde o novo tecido vascular e ósseo deve ser formado. Por exemplo, implantes para regeneração óssea devem apresentar taxas de biodegradação e formação de novo tecido ósseo com uma transferência gradual de carga entre os componentes, para prevenir atrofiamento e estimular a remodelação óssea<sup>(63)</sup>.

Até o presente momento, não se conhece um biomaterial sintético ideal, que ofereça todas as propriedades necessárias para regeneração óssea, o que significa que todos os biomateriais conhecidos apresentam limitações<sup>(100)</sup>. Dessa forma, a fim de aumentar o desempenho dos biomateriais com finalidade de regeneração óssea, a engenharia tecidual tem desenvolvido propostas que associam diferentes materiais, de modo a abranger diferentes propriedades individuais, para melhor desempenho da bioatividade e osteogênese por meio de arcabouço adequado para adesão e proliferação celular.

Nessa perspectiva, a W e o fosfato tricálcico TCP têm sido amplamente pesquisados para obtenção de sistema que estimula a liberação de fatores específicos, recrutamento de células precursoras de osteoblastos ou osteoblastos, bem como a capacidade de guiar a migração celular no local lesado, induzindo a diferenciação e proliferação tecidual<sup>(101,102)</sup>. Também os referidos minerais apresentam diferentes comportamentos de solubilidade, biodegradação e biorreabsorção quando implantados em sítio ósseo, o que possibilita gradual substituição pelo novo tecido formado e permanência de parte do sistema, ao longo do processo de regeneração óssea<sup>(103,81)</sup>.

## 5.4 FOSFATO TRICÁLCICO

Há décadas, as biocerâmicas de fosfatos de cálcio têm sido pesquisadas e empregadas para aplicações ósseas devido à biocompatibilidade e ao menor índice de rejeição por parte de organismo<sup>(104)</sup>. No entanto, existem diferentes tipos de fosfatos de cálcio que apresentam variadas taxas de biodegradação e biorreabsorção após implantação em sítio ósseo, como a hidroxiapatita, que tem sido empregada como biomaterial por possuir componentes similares ao tecido ósseo<sup>(105)</sup>.

No entanto, no decorrer do tempo, verificou-se que a hidroxiapatita sinterizada é frágil, não suportando aplicações de carga, bem como ficou evidente que não era biodegradável e dificilmente bioativa. Após implantada no organismo, os osteoclastos são incapazes de promover a rápida dissolução da hidroxiapatita, fazendo com que permaneça no local, sem ser substituída por tecido recém-formado. O comportamento não biodegradável da hidroxiapatita sinterizada não favorece o processo de regeneração óssea para uso clínico<sup>(106,107)</sup>. Tal fato se deve ao tratamento térmico em altas temperaturas, resultando na perda das suas características nanométricas e na sua alta cristalinidade.

Na tentativa de aumentar a taxa de dissolução e biodegradação das biocerâmicas à base de hidroxiapatita sinterizada, pesquisadores iniciaram uma abordagem com combinação de diferentes fases cristalinas de fosfatos de cálcio, a exemplo de hidroxiapatita e  $\beta$ -TCP, dando origem às biocerâmicas bifásicas que apresentam diferentes reabsorvibilidade<sup>(106)</sup>.

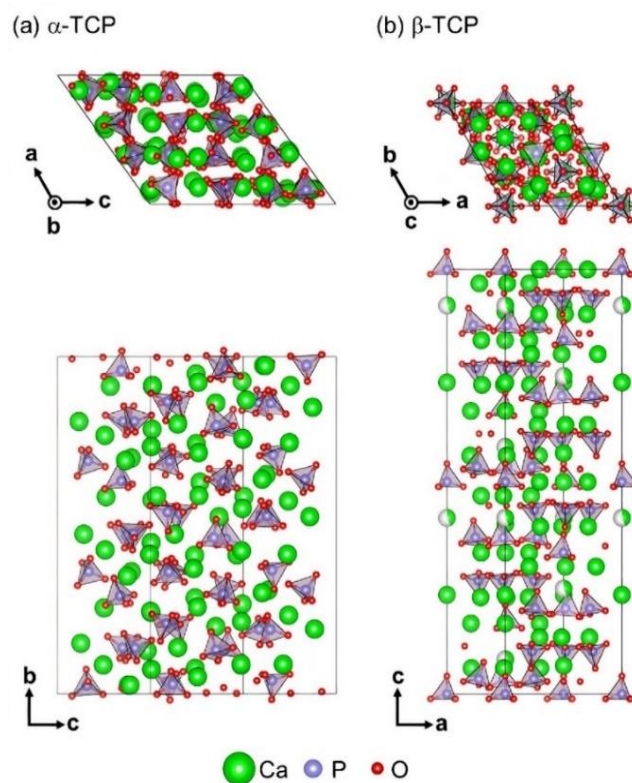
Os outros tipos de fosfatos de cálcio, a exemplo do TCP, apresentam melhores desempenhos para dissolução e biodegradação quando comparados à hidroxiapatita, sendo amplamente pesquisados e empregados no desenvolvimento de biocerâmicas com finalidade de regeneração óssea. Sua fórmula química é  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e pode ser obtida a partir da hidroxiapatita deficiente de cálcio<sup>(108)</sup>. Existem muitos outros tipos de fosfato de cálcio de interesse biológico e que são amplamente pesquisados para fins de aplicações biomédicas, no entanto, não fazem parte do escopo desta revisão de literatura.

É possível a obtenção de diferentes polimorfos do TCP, a depender do tratamento térmico escolhido no processo de sinterização. O polimorfo  $\beta$ -TCP é estável em baixas temperaturas e se converte em  $\alpha$ -TCP quando submetido a temperaturas acima de 1125 °C. Já a fase  $\alpha'$ -TCP ocorre acima de 1400 °C e a fase  $\gamma$ -TCP ocorre sob elevadas pressões. Cabe destacar que não existe um valor exato de temperatura para a mudança entre as fases cristalinas

e, a depender da temperatura empregada, ocorrerá a predominância de uma ou outra fase numa biocerâmica à base de TCP<sup>(109)</sup>.

Os polimorfos  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP têm a mesma composição química, diferindo na estrutura da rede cristalina, que proporciona diferentes comportamentos para biodegradação e biorreabsorção quando implantado em sítio ósseo, sendo o índice de solubilidade do  $\beta$ -TCP menor do que o do  $\alpha$ -TCP<sup>(110)</sup>. Dessa forma, é de se esperar que uma biocerâmica à base de  $\beta$ -TCP permaneça por maior tempo após implantação no organismo, quando comparado a uma biocerâmica à base de  $\alpha$ -TCP.

**Figura 3:** Representação da organização da rede estrutural dos polimorfos (a)  $\alpha$ -TCP e (b)  $\beta$ -TCP.



Fonte: Matsunaga e colaboradores (2015)<sup>(111)</sup>

Referente à bioatividade das biocerâmicas de TCP, destaca-se a habilidade de interação entre a interface sólido/meio biológico, que forma uma camada de fosfato de cálcio, promovendo osteogênese. Embora os polimorfos  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP tenham a mesma habilidade de osteocondução, o polimorfo  $\alpha$ -TCP apresenta maior bioatividade quando comparado ao

$\beta$ -TCP, sendo este fato atribuído ao arranjo estrutural dessa fase cristalina que possibilita maior solubilidade e maior quantidade de íons de cálcio e fosfato trocados com o meio biológico<sup>(112)</sup>.

Outro aspecto importante do TCP é a possibilidade de substituições catiônicas, por exemplo, o  $\beta$ -TCP possibilita que até cerca de 15% dos íons cálcio sejam trocados por íons de magnésio, sem mudanças significativas em sua estrutura, originando o composto denominado de  $\beta$ -TCP substituído por magnésio<sup>(17)</sup>. Outro exemplo é a possibilidade de o silício substituir o fósforo na rede do TCP, resultando na fase Si-TCP, ou promovendo a transição para o polimorfo  $\alpha$ -TCP, estabilizada com silício em temperaturas menor que o diagrama de fase convencional<sup>(113)</sup>.

## 5.5 WOLLASTONITA

A W é um metassilicato de cálcio, cuja origem pode ser natural ou sintética. Sua fórmula química é  $\text{CaSiO}_3$  e a constituição teórica é de ~ 51,75% em peso de  $\text{SiO}_2$ , e ~ 48,25% em peso de CaO. Trata-se de um mineral branco, com estrutura em cadeia, amplamente utilizada na indústria para fabricação de biocerâmicas, materiais plásticos, tintas, entre outras aplicações<sup>(114,115)</sup>.

Na natureza, a W é originada a partir dos processos de metamorfismo (calor e pressão) e metassomatismo (transformação química de uma rocha), que promovem a reação química entre o calcário rico em cálcio e da sílica rica em silício<sup>(116)</sup>. Comumente, apresenta impurezas como alumínio, ferro, potássio, sódio e outros elementos. Também as reservas naturais conhecidas de W são limitadas a alguns países asiáticos, europeu e da América do Norte. Por isso, a W sintética é preferida em função do baixo nível de impurezas, propriedades físico-químicas constantes e possibilidade de obtenção por diferentes rotas de produção<sup>(117)</sup>.

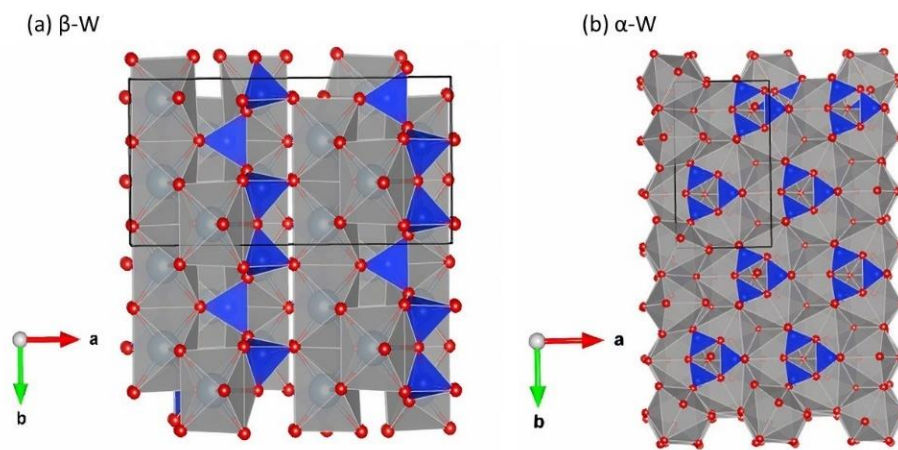
O processo de reação de estado sólido para obtenção da W envolve a sinterização de pós, fontes de cálcio e silício, que são misturados e levados a temperaturas entre 1200 e 1400 °C. Nesse processo, a mistura dos pós minerais ficam submetidos a temperaturas ligeiramente menores que suas temperaturas de fusão, criando alterações na sua estrutura de rede, possibilitando a obtenção de diferentes polimorfos<sup>(118)</sup>.

Esse mineral apresenta polimorfos, sendo aquele obtido em baixa temperatura (~1125 °C) chamado de parawollastonita ( $\beta$ -W); e o polimorfo de alta temperatura (~1200 °C) é chamado de pseudowollastonita ( $\alpha$ -W). Ambos polimorfos sintéticos têm sido amplamente

pesquisados com finalidade de aplicações ósseas, devido a suas propriedades únicas, como degradabilidade, excelente bioatividade, não toxicidade e biocompatibilidade<sup>(119)</sup>.

Núñez-Rodríguez e colaboradores (2018)<sup>(120)</sup> obtiveram os polimorfos  $\beta$ -W e  $\alpha$ -W, a partir de sinterização do pó de wollastonita natural, com alta pureza em temperaturas de 1200 e 1300 °C. Esses autores observaram que a transição da fase  $\beta$  para a fase  $\alpha$  ocorreu aproximadamente em 1250 °C. Ambos polimorfos foram colocados em fluido corporal simulado e foram avaliados com 1, 2 e 3 semanas, para análise da solubilidade e bioatividade. Os resultados indicaram que a solubilidade da  $\beta$ -W é superior à solubilidade da  $\alpha$ -W e a bioatividade de ambos materiais foi constatada por meio da formação de uma camada de apatita na superfície dos materiais. Os autores destacaram que a referida camada se assemelha às apatitas biológicas que compõem o tecido ósseo.

**Figura 4:** Representação da organização da rede estrutural da (a)  $\beta$ -W e (b)  $\alpha$ -W.



Fonte: Milani e colaboradores (2021)<sup>(116)</sup>

Estudos epidemiológicos já demonstraram que a W se mostra como um material não cancerígeno para humanos<sup>(121)</sup>. Ademais, o interesse na W para aplicações biomédicas ocorre devido ao fato de sua biocompatibilidade ser fonte de íons silício, com comportamento biológico ativo em fluido fisiológico<sup>(122)</sup>.

Por muito tempo não se deu a devida importância ao silício como oligoelemento. No entanto, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o silício desempenha um papel fundamental na biologia óssea, favorecendo sua regeneração e aumentando a densidade mineral óssea<sup>(16)</sup>. Atualmente, compreende-se que a deficiência dietética de silício produz efeitos negativos nos

tecidos conjuntivos e esquelético, despertando o interesse para seu uso como potencial tratamento para perdas óssea<sup>(15)</sup>.

O silício é um oligoelemento não metálico, obtido por meio dos alimentos e água potável. É denominado microelemento traço catalizador no metabolismo dos organismos vivos<sup>(123)</sup>. É amplamente distribuído por todo o corpo, com um forte predileção pelo tecido ósseo e conjuntivo<sup>(124)</sup>. No tecido ósseo, ele parece estar amplamente ligado aos glicosaminoglicanos, componente importante da matriz extracelular, além do colágeno e proteoglicanos<sup>(16)</sup>.

O silício desempenha papel direto no metabolismo ósseo. Por exemplo, em estudos *in vitro*, o silício foi capaz de aumentar a proliferação de osteoblastos, aumentar a atividade da fosfatase alcalina e a expressão da osteocalcina, marcadores de diferenciação osteogênica<sup>(125)</sup>. Também em estudo *in vitro*, ele demonstrou capacidade de promover diferenciação de osteoblastos e também angiogênese<sup>(15)</sup>. Dessa forma, entende-se que o silício têm efeitos significativos na dinâmica óssea, regeneração óssea e angiogênese.

De fato, estudos demonstram que biocerâmicas para aplicação óssea que contém silício apresentam melhores desempenhos que outros biomateriais que não o contêm nas composições. Tal fato é relacionado à formação espontânea de uma camada semelhante à apatita biologicamente ativa na superfície da biocerâmica, com efeito positivo adicional da vascularização dos tecidos moles adjacentes<sup>(70)</sup>.

Sun e colaboradores (2017)<sup>(126)</sup> avaliaram um biomaterial à base de fosfato de cálcio, substituído com diferentes concentrações de silício (2000, 260 e 32 ppm). Os resultados demonstraram que a presença do silício promoveu diferenciação e proliferação de osteoblastos. Os autores destacaram que, mesmo em baixa concentração de dopagem, o referido material promoveu ativação de genes importantes para diferenciação osteogênica (MAPK3, Fzd1, Wnt1, Lrp6 e BMP2), sugerindo a ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e a via de sinalização MAPK, que aumentaram o desempenho dos osteoblastos *in vitro*. Outro estudo demonstrou que cimentos de fosfato dicálcico desidratado dopado com silício, implantados em modelo femoral de rato, resultou numa atividade reabsortiva mais pronunciada, formação óssea mais significativa e maior presença de células semelhantes a osteoclastos quando comparado aos resultados do mesmo material não dopado<sup>(127)</sup>.

A W também apresenta maior resistência mecânica e bioatividade, quando comparada às biocerâmicas à base de fosfato de cálcio<sup>(23)</sup>. Seu comportamento de rápida reação, quando

em contato com fluidos fisiológicos, proporciona sua dissolução parcial (dissolução incongruente), com liberação de íons de cálcio e silício. Os íons de cálcio são trocados por íons de  $H^+$  do meio, originando uma camada de sílica amorfa em sua superfície, proporcionando precipitação de uma fase inorgânica semelhante à apatita biológica<sup>(128,129)</sup>.

De acordo com Barbosa e colaboradores (2019)<sup>(130)</sup>, a W apresenta biocompatibilidade e reatividade em fluido fisiológico, apresentando solubilização e consequente liberação de silício no local do implante, ao mesmo tempo que é substituída por tecido osso recém-formado. Também os referidos autores destacam que estudos mais recentes confirmaram que a W pode ser usada como material de enxerto ósseo para promover a cicatrização de fraturas.

A revisão sistemática de Almeida e colaboradores (2018)<sup>(78)</sup> demonstrou que biomateriais desenvolvidos com associação da W e outros biomateriais, entre eles TCP, mostrou-se viável como material para enxerto ósseo em modelos animais experimentais. Esse estudo também demonstrou a versatilidade da W nas aplicações em compósitos com diferentes tipos de biomateriais cerâmicos e polímeros. Já a revisão sistemática com metanálise de Santos, Meireles e Miguel (2020)<sup>(6)</sup> concluiu que a associação da W e TCP na forma de compósito apresenta potencial para aplicação clínica, pois todos os estudos incluídos demonstraram potencial para regeneração óssea em modelos animais experimentais. Esse estudo também demonstrou a versatilidade da W como componente de biomateriais nos formatos de microesferas e *scaffold*. Corroborando com tais estudos, Santos e colaboradores (2021)<sup>(8)</sup> avaliaram a capacidade de reparo ósseo com *scaffolds*, desenvolvidos com diferentes proporções em peso de W (20%, 60% e 80%), implantados em calvária de ratos. Os resultados histológicos evidenciaram em todos os grupos formação de tecido ósseo e bioatividade notória.

## 5.6 VITROCERÂMICAS À BASE DE W E TCP

De forma geral, as vitrocerâmicas compreendem materiais inorgânicos policristalinos que contêm cristais e fase vítrea residual (vidro amorfo), obtidas por meio de materiais susceptíveis à cristalização controlada. Por apresentarem uma ou mais fases vítreas e cristalinas, as vitrocerâmicas apresentam combinação de fases amorfas e redes cristalinas organizadas, que proporcionam amplas possibilidades de composições, para diferentes aplicações na indústria, como para fins biomédicos<sup>(131)</sup>.

Para obtenção das vitrocerâmicas, um método comum é o processo de sinterização, no qual pós de vidro são submetidos a tratamento térmico em temperaturas inferiores à sua



temperatura de fusão, criando alterações na microestrutura do elemento base do material. Nessa condição, várias reações ocorrem no estado sólido do elemento, com simultânea ou subsequente cristalização da superfície das partículas do material, provocando, por exemplo, a mudança espontânea para outros tipos de polimorfos, quando o material atinge determinada temperatura<sup>(132)</sup>.

O processo de sinterização possibilita o controle da estrutura híbrida durante a produção das vitrocerâmicas, com obtenção de amplas propriedades que conferem grande versatilidade para as devidas aplicações. Uma vantagem desse método é a não necessidade de utilizar agentes nucleantes nas composições das vitrocerâmicas, visto que a própria superfície das partículas fornece locais favoráveis para formação de cristais<sup>(131)</sup>.

As vitrocerâmicas obtidas por meio de sinterização apresentam propriedades dependentes dos cristais formados, das frações volumétricas, da forma, do tamanho, da distribuição da fase vítrea e da presença de porosidade residual. No caso de vitrocerâmicas com finalidade de regeneração óssea, a porosidade residual é uma vantagem, comumente empregada no desenvolvimento de biomateriais para esse tipo de aplicação, uma vez que durante a produção pode-se controlar a forma, o tamanho e a distribuição dos poros no material<sup>(133)</sup>. Dessa forma, por meio de sinterização, podem-se obter vitrocerâmicas com estruturas que apresentam diferentes fases cristalinas e porosidades, que dependem das cinéticas de cristalização e da temperatura empregada no processo. Ademais, tais propriedades conferem à vitrocerâmica características que determinam sua resistência mecânica e reatividade química quando em contato com fluidos.

De particular interesse, uma vitrocerâmica com potenciais para regeneração óssea deve ter características que favoreçam sua interação com o organismo vivo ao mesmo tempo em que possibilita sua substituição por novo tecido ósseo, ou seja, características tais como biocompatibilidade, bioatividade, resistência mecânica, taxa de biodegradação compatível com formação do novo tecido, além de degradar em componentes não tóxicos e não provocar resposta imune crônica<sup>(134)</sup>.

Com finalidade de regeneração óssea, as vitrocerâmicas à base de W e TCP têm sido amplamente estudadas nas últimas décadas devido à sua alta bioatividade e à maior resistência mecânica em comparação com outros biovidros e biocerâmicas de fosfatos de cálcio. Kokubo e colaboradores (1985)<sup>(135)</sup> foram os primeiros a utilizar apatita e W, para obtenção de composição de fases cristalinas em uma matriz vítrea. Outras publicações relatam associação

da W e fosfatos de cálcio como forma de se obter vitrocerâmicas com melhores desempenhos nas aplicações ósseas<sup>(136,102,103,129,122)</sup>.

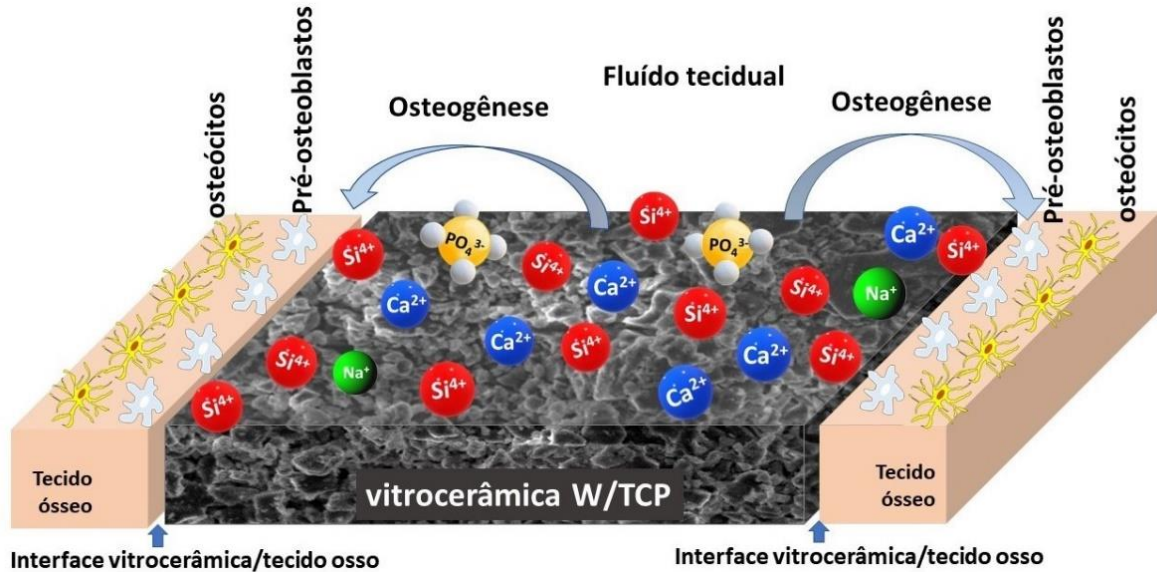
Embora a fase W apresente excelentes resultados para a osteogênese, sua alta reatividade em meio fisiológico com alta taxa de dissolução não proporciona a estabilidade necessária para a formação de osso novo em longo prazo. Desta forma, fosfatos de cálcio como o TCP, entre outros, são utilizados como fase que apresenta biodegradação e biorreabsorção mais lenta em comparação a W, servindo de arcabouço ao longo do processo de reparação óssea, promovendo a estabilidade local. Embora o TCP seja menos bioativo que a fase W, a taxa mais lenta de liberação de cálcio e fosfato fornece, ao longo do processo de reparação óssea, íons de cálcio e fosfato, de grande importância para mineralização do tecido recém-formado<sup>(17,106)</sup>.

A fase W na vitrocerâmica apresenta alta reatividade em fluidos, com rápida dissolução e liberação de silício e cálcio, favorecendo a precipitação de uma camada de apatita osteocondutora e a diferenciação de células precursoras de osteoblastos<sup>(137)</sup>. O efeito da rápida dissolução e da biorreabsorção mediada por fluido fisiológico pode mimetizar fatores derivados da matriz óssea, liberados durante a biorreabsorção osteoclástica na remodelação biológica, aumentando a diferenciação das células precursoras de osteoblastos e a produção de novo tecido ósseo<sup>(138)</sup>.

De fato, biomateriais compósitos cujas fases minerais demonstrem diferentes taxas de biodegradação e biorreabsorção após implantação em sítio ósseo têm se mostrado promissores<sup>(139)</sup>. A rápida dissolução de parte do biomaterial promove liberação de íons bioativos favorecendo a osteogênese, enquanto a biodegradação e biorreabsorção mais lenta de fases residuais permitem a liberação contínua de importantes íons, tais como cálcio e fosfato, regulando favoravelmente os mecanismos para a formação de novo tecido ósseo, em diferentes fases da reparação óssea.

Dessa forma, a dissolução, biodegradação e biorreabsorção progressiva das diferentes fases minerais propiciam maior osteogênese inicial e funcionam como arcabouço, regulando favoravelmente a dinâmica de formação e biorreabsorção óssea em diferentes estágios do processo de reparação óssea.

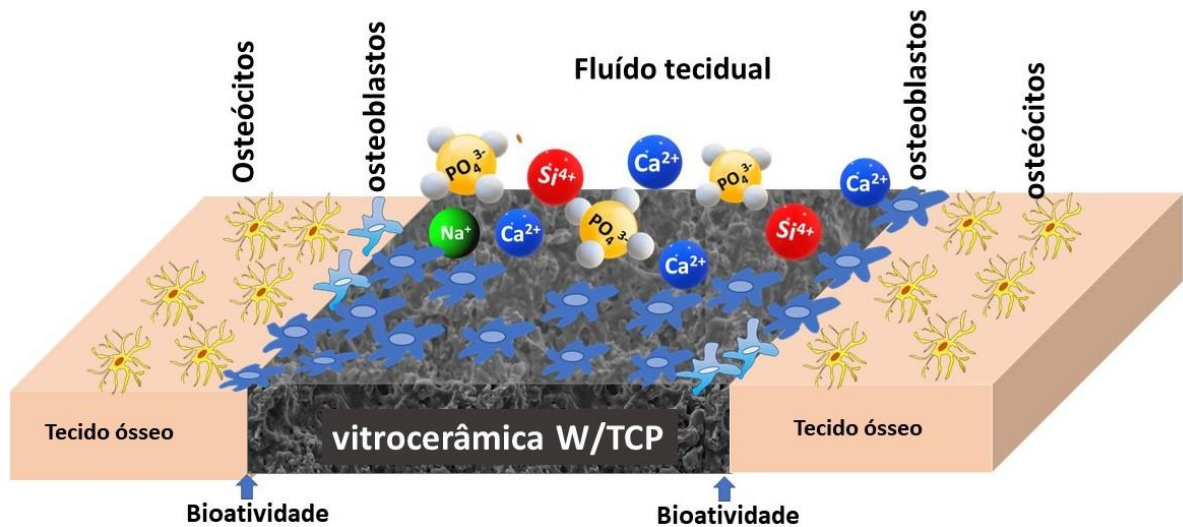
**Figura 5:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura modificada representa a dissolução inicial de uma vitrocerâmica à base de W e TCP após implantação em sítio ósseo.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Nota: A rápida dissolução inicial da W (silicato de cálcio) promove maior liberação de íons cálcio e silício estimulando a osteogênese por meio do recrutamento das células pré-osteoblásticas para o local do implante.

**Figura 6:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura modificada representa a biodegradação e biorreabsorção gradual de uma vitrocerâmica à base de W e TCP implantada em sítio ósseo.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Nota: A diferenciação dos pré-osteoblastos em osteoblastos promove aumento das células especializadas para formação da matriz orgânica, enquanto a permanência de fases residuais do biomaterial servem como arcabouço para migração e adesão dos osteoblastos no local do implante, com liberação contínua dos íons cálcio e fosfato, importantes para mineralização do tecido formado.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 TIPO DE PESQUISA

Trata-se de uma pesquisa exploratória experimental, desenvolvida em consonância com os conceitos postulados por Gil (2002)<sup>(140)</sup>. Entende-se que uma pesquisa exploratória proporciona informações para preencher as lacunas de conhecimento que aparecem sobre determinado tema, fornecendo subsídios para maior compreensão do problema de pesquisa.

### 6.2 VITROCERÂMICAS

As vitrocerâmicas foram preparadas com a mistura de pós dos minerais wollastonita natural ( $\text{CaSiO}_3$ , NYCO, NYAD M1250) e fosfato tricalcico ( $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ , Sigma-Aldrich), com as proporções percentuais em peso (W%/TCP%) de W20/TCP80, W40/TCP60, W60/TCP40 e W80/TCP20. Cada proporção foi separadamente umedecida em isopropanol, homogeneizadas em moinho de bolas (zircônia 3 mm de diâmetro) durante 15 minutos, formando uma pasta. Em seguida, procedeu-se à secagem a 60 °C, durante o período de 12 horas, e sinterização a 1250 °C de acordo com o ponto eutético do sistema binário W-TCP, que corresponde à proporção de 60% W e 40% de TCP<sup>(113)</sup>. As outras vitrocerâmicas foram formuladas considerando-se os extremos da proporção percentual em peso, sendo, W20/TCP80 e W80/TCP20. Dessa forma, os tempos utilizados para sinterização foram: W20/TCP80 = 5 min; W60/TCP40 = 60 minutos; e, W80/TCP20 = 180 min. Em seguida, procedeu-se ao processamento em britador de mandíbulas e seleção dos grânulos, com tamanhos entre 400 e 600  $\mu\text{m}$  através de peneiramento. Previamente às análises, as vitrocerâmicas foram colocadas individualmente em frascos de vidro refratário e esterilizadas a seco durante duas horas em temperatura de 160 °C.

Os dados das caracterizações elementar, porosidade e cristalinidade das vitrocerâmicas foram fornecidos pelo laboratório fabricante, asseguradas as proporções percentuais em peso de W e TCP das vitrocerâmicas, bem como as características físico-químicas necessárias para a interação entre o biomaterial e o organismo receptor (rato).

A amostra W40/TCP60 foi utilizada de forma parcial (Artigo 1), pois, por questões técnicas, não foi possível dar continuidade à síntese de um novo lote e consequente avaliação do biomaterial.

### 6.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICS/UFBA, sob o protocolo nº 128/2017 (anexo A), em consonância com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e de acordo com as orientações constantes no *Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório* da National Academy of Sciences (2011)<sup>(141)</sup>.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Núcleo de Pesquisa Experimental, da Faculdade de Medicina da UFBA – *Campus* do Canela.

Utilizaram-se o total de 76 ratos *Wistar (Rattus norvegicus)*, machos, adultos, com massa corpórea entre 350 e 400 g e idade aproximada de 3 a 4 meses, que permaneceram no biotério em caixas plásticas individuais, sob temperatura de 22 °C ( $\pm 2$ ), expostos a períodos alternados de 12 horas luz e 12 horas escuridão, recebendo ração e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em grupos experimentais, de acordo com cada etapa da pesquisa. Para a primeira etapa, adotaram-se os seguintes critérios: quatro grupos (n=3), que receberam implante com uma vitrocerâmica e foram denominados W20/TCP80, W40/TCP60, W60/TCP40 e W80/TCP20, mais um grupo controle negativo (defeito ósseo vazio), que não recebeu implantação com vitrocerâmica. Na segunda etapa, os grupos foram organizados da seguinte forma: animais distribuídos em três grupos (n=16), que receberam implante com uma vitrocerâmica, e foram denominados W20/TCP80, W60/TCP40 e W80/TCP20, mais um grupo controle positivo (calvária íntegra).

### 6.4 DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO

O modelo de defeito ósseo crítico utilizado no presente trabalho é conhecido e empregado por algumas décadas para avaliação do reparo ósseo, com ou sem implantação de biomateriais<sup>(142)</sup>.

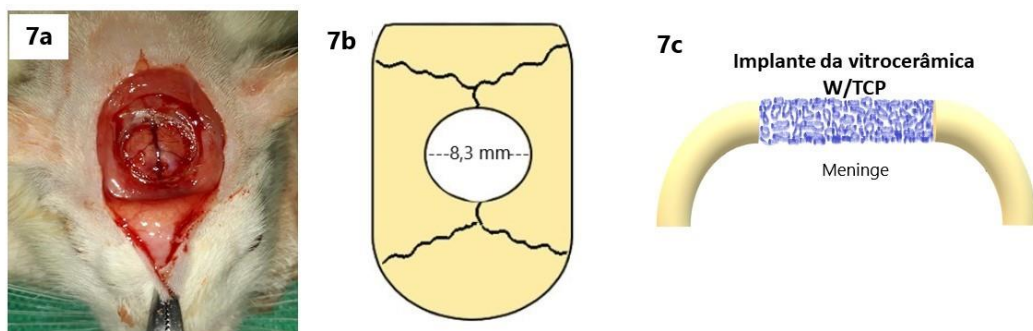
Trata-se da remoção do fragmento ósseo circular com aproximadamente 8 mm de diâmetro, na porção central da calvária de rato. Previamente à sua confecção, os animais receberam sedação e anestesia, realizadas por injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (Dopalen®) na proporção de 7 mg/100 g de massa corporal, e cloridrato de xilazina (Anasedan®), na proporção de 0,8 mg/100g de massa corporal. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito ventral, tricotomizados na região da calvária e submetidos à

antisepsia do campo operatório com álcool iodado, sendo posicionados em bancada utilizada para as cirurgias experimentais.

A técnica cirúrgica empregada na confecção do defeito ósseo crítico observou o protocolo descrito por Miguel e colaboradores (2006)<sup>(143)</sup> e ilustrado por Santos e colaboradores (2019)<sup>(144)</sup>, com acesso cirúrgico obtido na porção mediana da calvária, através de incisão cutânea bicoronal, com aproximadamente 3 cm de extensão, mediante a utilização de lâmina de bisturi nº15, e seguida da exposição do periósteo e sua remoção para exposição do tecido ósseo. A elevação do retalho permitiu acesso ao periósteo, que foi removido com espátula nº 7 (Duflex®) e pinça clínica (Duflex®) para exposição do tecido ósseo. O defeito ósseo foi confeccionado com uso de uma fresa trefina (Dentoflex®), montada numa peça de mão, em contra ângulo (Driller®), com redução de 16:1, acoplado em motor para implante (Driller®), a 1500 rpm, sob irrigação constante com solução fisiológica 0,9%.

Um fragmento circular de tecido ósseo foi removido, expondo as membranas meníngeas e o tecido nervoso subjacente. O procedimento garantiu a retirada da porção óssea, do periósteo e endósteo que têm a capacidade para estimular a osteogênese. A área total do defeito confeccionado corresponde à dimensão de cerca de 8,3 mm de diâmetro (8,0 mm de diâmetro mais 0,3 mm correspondente à espessura da fresa utilizada), considerada como um defeito ósseo crítico, sendo o organismo incapaz de promover a reparação óssea espontânea no local. Após confecção do defeito ósseo crítico, a vitrocerâmica foi hidratada em SF 0,9% e implantada preenchendo toda área (Figura 7), seguido de reposicionamento do retalho e sutura com pontos interrompidos no tecido cutâneo.

**Figura 7:** Confecção do defeito ósseo crítico em calvária de rato *Wistar*.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2021.

**Nota:** (7a) remoção do fragmento ósseo, periósteo e endósteo. (7b) representação do defeito ósseo em vista superior, (7c) representação do implante da vitrocerâmica em corte coronal.

Após o término do procedimento cirúrgico, os ratos foram colocados em caixas plásticas individuais forradas com maravalha de pinus e monitorados em ambiente silencioso, de pouca luz e com temperatura controlada entre 27 e 30 °C até a completa recuperação anestésica. Em seguida, foram devolvidos ao biotério onde permaneceram até o dia da eutanásia, de acordo com os diferentes períodos previstos para as análises.

Em cada ponto biológico previsto para análise (07, 15, 45 e 120 dias), subgrupos de animais foram eutanasiados com injeção letal de cloridrato de quetamina (Dopalen<sup>®</sup>), na proporção de 35 mg/100 g de massa corporal, e de cloridrato de xilazina (Anasedan<sup>®</sup>), na proporção de 4mg/100g de massa corporal, via intraperitoneal. Em seguida, foram dissecados para exposição da calvária, com o descarte de todo tecido mole circunvizinho, com exceção da dura-máter e do perióstio. Os espécimes foram fixados em formaldeído tamponado a 4% por 48 horas e reduzidos com disco de carborundum nº 409, acoplado a um mandril e a uma microrretífica (Dremel<sup>®</sup>), sendo guardados sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C.

## 7 RESULTADOS

Os resultados desta pesquisa estão documentados sob a forma três artigos científicos e um capítulo de livro, sendo:

- ✓ Artigo 1: **Analysis of the behavior of a biomaterial based on wollastonite/TCP in the implant process of an experimental model of critical bone defects**, publicado na revista *Research, Society and Development* (ISSN: 2525-3409), volume 10, número 7, em 2 de julho de 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16800>. Autores: Mauricio Mitsuo Monção, Raísa Cavalcante Dourado, Luísa Queiroz Vasconcelos, Isabela Cerqueira Barreto e Roberto Paulo Correia de Araújo;
- ✓ Artigo 2: **Raman spectroscopy analysis of wollastonite/tricalcium phosphate glass-ceramics after implantation in critical bone defect in rat**. Aceito para publicação na revista *Materials Sciences and Applications* (ISSN: 2153-117X). Autores: Mauricio Mitsuo Monção, Isabela Cerqueira Barreto, Fúlvio Borges Miguel, Luiz Fernando Cappa de Oliveira, Raul Garcia Carrodeguas, Roberto Paulo Correia de Araújo (**Carta de aceite para publicação em anexo B**).
- ✓ Artigo 3: **Compositional analysis and structural phases of glass-ceramics developed with different proportions of Wollastonite and TCP using Raman spectroscopy**. Submetido para avaliação em periódico indexado. Autores: Mauricio Mitsuo Monção, Luiz Fernando Cappa de Oliveira, Isabela Cerqueira Barreto e Roberto Paulo Correia de Araújo (**Submissão em anexo C**).
- ✓ Capítulo de livro: **“Vitrocerâmicas à base de wollastonita e fosfato tricálcico para regeneração óssea”**, integrante do livro **Saúde e Reabilitação – o Ponto de Equilíbrio V.1**, submetido ao Conselho Editorial da EDUFBA (Editora da Universidade Federal da Bahia). Autores Mauricio Mitsuo Monção, Isabela Cerqueira Barreto e Roberto Paulo Correia de Araújo (**Declaração em anexo D e súmula em anexo E**).



## 7.1 ARTIGO 1: Analysis of the behavior of a biomaterial based on wollastonite/TCP in the implant process of an experimental model of critical bone defects

Research, Society and Development, v. 10, n. 7, e55110716800, 2021  
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16800>

### Analysis of the behavior of a biomaterial based on wollastonite/TCP in the implant process of an experimental model of critical bone defects

Análise do comportamento de um biomaterial a base de wollastonita/TCP no processo de implantação em modelo experimental de defeito ósseo crítico

Análisis del comportamiento de un biomaterial basado en wollastonita/TCP en el proceso de implementación en un modelo experimental de defecto óseo crítico

Received: 06/04/2021 | Reviewed: 06/14/2021 | Accept: 06/18/2021 | Published: 07/02/2021

**Mauricio Mitsuo Monção**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0183-1992>

Federal Institute of Education, Science and Technology of Bahia, Brazil

E-mail: [maurimitsuo@yahoo.com.br](mailto:maurimitsuo@yahoo.com.br)

**Raisa Cavalcante Dourado**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1446-0641>

University of Bahia, Brazil

E-mail: [raisadourado@yahoo.com.br](mailto:raisadourado@yahoo.com.br)

**Luisa Queiroz Vasconceos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3916-8682>

University of Bahia, Brazil

E-mail: [luisa-queiroz@hotmail.com](mailto:luisa-queiroz@hotmail.com)

**Isabela Cerqueira Barreto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2663-7395>

University of Bahia, Brazil

E-mail: [isabelacbarreto@hotmail.com](mailto:isabelacbarreto@hotmail.com)

**Roberto Paulo Correia de Araújo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7648-728X>

University of Bahia, Brazil

E-mail: [rparaujo@hotmail.com](mailto:rparaujo@hotmail.com)

#### Abstract

This study analyzes the clinical, macroscopic and radiographic characteristics of a biomaterial with different proportions of wollastonite (W) and tricalcium phosphate (TCP) on bone tissue regeneration during the implantation process of an experimental model of critical bone defects. Fifteen Wistar rats were used, randomly distributed in 5 groups (n = 3), with a bone defect created on an 8.0 mm diameter calvaria. 4 groups received implants with different proportions of W%/TCP%, referred to as W20/TCP80, W40/TCP60, W60/TCP40 and W80/TCP20. The fifth control group (GC) was filled with blood clot only. Clinical evaluation was performed every 24 hours, and after 7 days, the animals were euthanized. The calvaria were dissected and analyzed macroscopically and by radiography. All study groups showed a satisfactory clinical evolution. The macroscopic analysis showed filling of the bone defect with granules surrounded by newly formed tissue, and the radiographic analysis showed different patterns of displacement of the biomaterial. The study concluded that the different proportions of W%/TCP% were well tolerated by the study groups and demonstrated biocompatibility. The enhanced hydrophilic behavior of the W40/TCP60, W60/TCP40 and W80/TCP20 groups favored the application in the experimental model *in vivo*.

**Keywords:** Biomaterials; Bone regeneration; Calcium silicate; Calcium phosphates.

#### Resumo

O objetivo deste trabalho foi analisar características clínicas, macroscópicas e radiográficas de um biomaterial com diferentes proporções de wollastonita (W) e fosfato tricálcico (TCP) no processo de implantação em modelo experimental de defeito ósseo crítico, com finalidade de regeneração tecidual óssea. Foram utilizados 15 ratos Wistar, distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (n = 3), sendo confeccionado um defeito ósseo na calvária de 8,0 mm de diâmetro, onde 4 grupos receberam implantes com uma diferente proporção de W%/TCP%, denominados W20/TCP80, W40/TCP60, W60/TCP40 e W80/TCP20, e um grupo controle (GC) preenchido somente com coágulo sanguíneo. Realizou-se avaliação clínica a cada 24 horas, e após 7 dias, os animais foram eutanasiados, a calvária dissecada e analisada macroscopicamente e por radiografias. Todos os grupos do estudo apresentaram evolução clínica satisfatória. A análise macroscópica demonstrou preenchimento do defeito ósseo com grânulos envoltos por tecido neoformado, e a análise radiográfica evidenciou diferentes padrões de deslocamento do biomaterial. Concluiu-se que as diferentes proporções de W%/TCP% foram bem toleradas pelos grupos de estudo e demonstraram

biocompatibilidade. O comportamento de maior hidrofiliidade dos grupos W40/TCP60, W60/TCP40 e W80/TCP20 favoreceu a aplicação no modelo experimental *in vivo*.

**Palavras-chave:** Biomateriais; Regeneração óssea; Silicato de cálcio; Fosfatos de cálcio.

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue analizar el características clínicas, macroscópicas y radiográficas de un biomaterial con diferentes proporciones de wollastonita (W) y fosfato tricálcico (TCP) en el proceso de implantación en un modelo experimental de defecto óseo crítico, con el propósito de regenerar tejido óseo. Se utilizaron quince ratas Wistar, distribuidas aleatoriamente en 5 grupos ( $n = 3$ ), con un defecto óseo en la calvaria de 8.0 mm de diámetro, donde 4 grupos recibieron implantes con diferente proporción de W%/TCP%, denominados W20/TCP80, W40/TCP60, W60/TCP40 y W80/TCP20, y un grupo de control (GC) lleno solo de coágulo de sangre. La evaluación clínica se realizó cada 24 horas, y después de 7 días, los animales fueron sacrificados, la calvaria disecada y analizada macroscópicamente y por radiografía. Todos los grupos de estudio mostraron una evolución clínica satisfactoria. El análisis macroscópico mostró relleno del defecto óseo con gránulos rodeados de tejido neoformado y la análisis radiográfica mostró diferentes patrones de desplazamiento del biomaterial. Se concluyó que las diferentes proporciones de W%/TCP% fueron bien toleradas por los grupos de estudio y demostraron biocompatibilidad. El mayor comportamiento de hidrofiliidad de los grupos W40/TCP60, W60/TCP40 y W80/TCP20 favoreció su aplicación en el modelo experimental *in vivo*.

**Palabras clave:** Biomateriales; Regeneración óssea; Silicato de calcio; Fosfatos de calcio.

## 1. Introduction

Tissue engineering seeks new technologies and biomaterials capable of treating extensive bone loss more efficiently when the possibility of spontaneous repair does not exist. From this perspective, there is current interest from researchers in the development of composite biomaterials, to develop physical-chemical properties that favor complex bone regeneration processes (Tanner, 2009; Santis, Guarino and Ambrosio, 2019).

Silicate glasses and calcium phosphate ceramics have been the focus of research seeking composite biomaterials that can fulfill the requirements for the structural and functional repair of bone tissue. Amongst such materials, wollastonite (W) has been widely studied as it presents biocompatibility, high mechanical resistance, and excellent bioactivity (Ke, *et al.*, 2017). In addition, there is great interest in the tricalcium phosphate (TCP) phases which have crystallographic and chemical characteristics similar to the mineral phase of human bone tissue (Canillas, 2017; Grandi, 2011). These intrinsic properties have resulted in research developing composite biomaterial based on W and TCP with different proportions and can be associated with other biocompatible materials (Souza, 2020; Bagherifard, 2020).

It is understood that the development of materials intended to interact with biological systems to treat, augment or replace tissues, require adequate evaluation before application in humans. Experimental models utilizing an 8 mm diameter circular bone defect created in a rat calvaria are widely used in studies with biomaterials that evaluate bone repair (Schmitz, 1986). In these dimensions, the manufactured bone defect is referred to as critical, and allows analysis of the recipient's biological response to an implanted material without the interference of spontaneous bone repair (Takagui and Urist, 1982).

However, the evaluation of new biomaterials for bone regeneration can be compromised by numerous factors, which include the type of experimental model used during the *in vivo* test phase (Accorsi-Mendonça, *et al.*, 2011). This study therefore analyzes the behavior of a biomaterials with differing proportions of W%/TCP% in the implantation process using critical bone defect model in rat calvaria. The study investigates the relevant clinical aspects, together with the physical requirements necessary for the safe application in the experimental model *in vivo* that favor bone tissue regeneration.

## 2. Methodology

### 2.1 Biomaterial

The experimental biomaterial used in the present study was created by mixing and sintering the minerals W and TCP, employing four different proportions of W%/TCP%, W20/TCP80, W80/TCP20, W40/TCP60 and W60/TCP40, into porous



granules with sizes between 400 ~ 600  $\mu\text{m}$  and similar macroscopic aspects (Figure 1). The biomaterial was sterilized in a drying oven then fractionated in polypropylene tubes which had been previously labeled and sterilized by moist heat.

**Figure 1:** Macroscopic aspects of biomaterial W%/TCP%.



Source: Created by the authors (2021).

## 2.2 Experimental groups

The Ethics Committee on the Use of Animals at the University of Bahia, Bahia, Brazil, approved the experimental protocol No. 128/2017. The research applied the criteria for animal care developed by the *National Academy of Sciences* and described in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NRC, 2011), and followed the norms of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). Male albino rats (*Rattus norvegicus*) of the Wistar lineage with body mass between 350 and 400 g and age of approximately 4 to 5 months were used. The animals were kept in the vivarium in individual cages measuring 20 x 30 x 40 cm, covered with an autoclaved pine shavings bed. They received food and water without restrictions and were acclimatized to a temperature of 22 °C ( $\pm 2$ ), with alternating periods of light and darkness (12:12 hours). The animals were randomly distributed in 5 experimental groups of 3 animals each and underwent surgery to create a critical bone defect in a central portion of the calvaria. Four groups then received the biomaterial with one of the different proportions of W%/TCP%, called W20/TCP80, W40/TCP60, W60/TCP40 and W80/TCP20. Only 1 group, the control group (CG), did not receive implantation of biomaterial and the critical bone defect was filled by a blood clot.

## 2.3 Pre-surgical

The animals were sedated and anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (Dopalen®) in the proportion of 7 mg / 100 g of body mass, and xylazine hydrochloride (Anasedan®) in the proportion of 0.8 mg / 100 g of body mass. They were then placed in a prone position, the calvaria region was then shaved and submitted to antisepsis of the operative area with iodized alcohol.

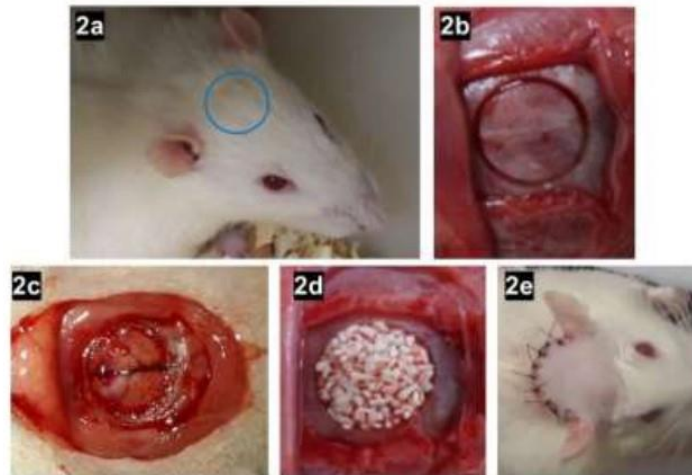
## 2.4 Surgical

Aseptic techniques were rigorously observed throughout the procedure. The surgical technique employed in making the critical bone defect followed the protocol described by Spicer, *et al.* (2012). Surgical access was obtained in the median portion of the calvaria. A bicoronal cutaneous incision approximately 3 cm in length was made using the scalpel blade No. 15 and followed by the exposure and removal of the periosteum to expose the bone tissue. The elevation of the flap allowed access to the periosteum, which was removed with a spatula No. 7 (Duflex®) and clinical tweezers (Duflex®) to expose the bone tissue.

To create the critical bone defect, an 8.0 mm diameter trephine cutter (Dentoflex ®), was mounted on a contra angle (Driller ®) with a 16:1 reduction, coupled to an implant engine (Driller ®). The defect was drilled at 1500 rpm under constant

irrigation with saline solution. Following the creation of the defect, a circular fragment of bone tissue was removed from the upper portion of the calvaria exposing meningeal membranes and the underlying nervous tissue. The biomaterial was then implanted filling the entire area, followed by repositioning of the flap, and suturing with interrupted stitches in the cutaneous tissue. Aspects of the surgical process are shown in Figure 2.

**Figure 2:** Surgical process for creating and implanting the biomaterial in a critical bone defect.

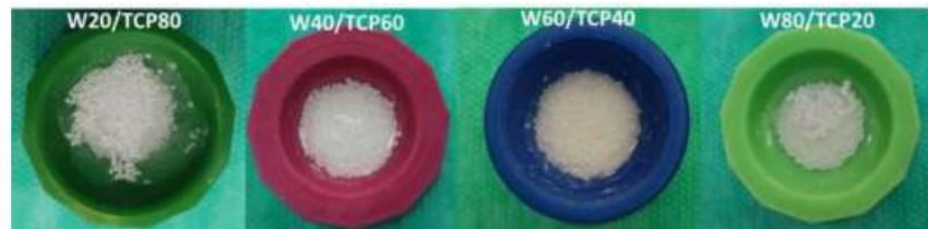


Note: (2a) Location of the median portion of the calvaria. (2b) Skin incision and exposure of the periosteum, its removal and exposure of bone tissue. (2c) Removal of the bone fragment visualization of the critical bone defect. (2d) Implementation of the granulated biomaterial. (2e) Suture in simple stitches.

Source: Created by the authors (2021).

Prior to implantation in the bone defect model, biomaterials were hydrated with 0.9% saline (SF) at room temperature (Figure 3).

**Figure 3:** Aspects of the different proportions of W%/TCP% after hydration with SF 0.9%.



Source: Created by the authors (2021).

## 2.5 Post-surgical

After surgery, the animals were placed in individual boxes and monitored in a quiet, low-light environment with a controlled temperature between 27 and 30 °C until complete recovery from anesthesia. They were then returned to the vivarium where they remained for seven days under the same conditions preceding the surgical process.

## 2.6 Clinical evaluation of animals

For seven days, corresponding to the post-surgical inflammatory phase, the animals were evaluated every 24 hours. The state of wakefulness, motor activity, temperament, posture, consumption of water and feed, excretion of urine and feces,



were recorded together with the aspects of the surgical wound. Suppression of suffering and pain was predicted according to the Rat Grimace Scale (Sotocina, *et al.*, 2011), which scores based on pain signals in rodents and indicates the need for analgesics for mild, moderate, and severe pain. Antibiotic prophylaxis was not performed, and the surgical wound was evaluated for inflammatory signs of erythema and edema together with the suture to identify possible infection.

### **2.7 Euthanasia and collection of calvaria.**

When the seven day biological point was reached the animals were euthanized with intraperitoneal lethal injection of ketamine hydrochloride (Dopalen®) in the proportion of 35 mg / 100 g of body weight and xylazine hydrochloride (Anasedan®) in the proportion of 4 mg / 100 g of body weight. The rats were then dissected to expose the calvaria, disposing of all surrounding soft tissue except for the dura mater and periosteum. The specimens were fixed in 4% buffered formalin for 48 hours and reduced with carborundum disk No. 409 coupled to a mandrel and micro-grinding (Dremel®).

### **2.8 Macroscopic and radiographic analysis**

The samples were subjected to macroscopic analysis with the aid of a 10x magnifying lens with polarized light (Lorben®). Two trained examiners inspected the explanted calvaria for texture and transparency of the soft tissues and evaluated possible abnormal infiltrates, thickening or defects of any type, as well as the presence or absence of the biomaterial that was implanted in the surgical bed. Subsequently these samples were x-rayed using a digital CMOS sensor (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) and optical fiber, external dimensions of 36.7 mm x 24.3 mm and theoretical resolution of 20  $\mu$ m / mm. Image receiver focus distance of 40 cm was used for and X-ray beam produced with 60 KVp, 2 mA and 0.18 seconds of exposure.

## **3. Results**

In general, the animals tolerated the surgical procedure well, became active and gradually returned to the diet of food and water without restriction. During the seven days of observation, there no animals died nor signs that indicated moderate or severe pain requiring analgesia. All animals in groups W40/TCP60 and W60/TCP40 showed similar aspects to animals in the CG during the waking state, being active in the presence of light and obtaining water and feed ad libitum, as well as similar evolution and no signs of exacerbation during the inflammatory phase.

Most animals in groups W20/TCP80 and W80/TCP20 followed a period similar to the CG, however, one animal in each group showed a waking state with less activity and smaller orbital opening when exposed to light in the first 48 hours after surgery. These animals showed increased signs of inflammation in the surgical wound, such as erythema and edema, without occurrence of dehiscence or discharge from the wound. At the end of the experimental period, these two animals showed delayed healing in relation to the other study groups.

The dissection of the calvaria verified that all the study groups showed formation of a transparent gelatinous tissue, involving the granules of the biomaterial. After complete dissection of the entire upper portion of the calvaria and removal of the soft tissues, filling of the created bone defect model with the biomaterial was observed (Figure 4).

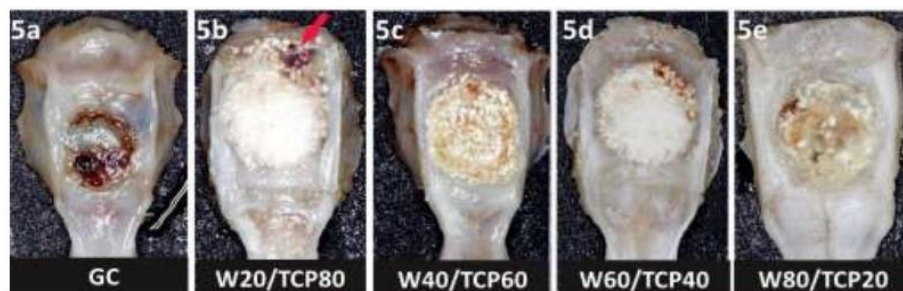
**Figure 4:** An example of calvaria demonstrates filling and tissue formation that involving granules of the biomaterial.



Note: all groups that received implants demonstrate similar filling and tissue formation that enveloped the biomaterial granules.  
 Source: Created by the authors (2021).

Aspects by group are shown in the calvaria specimens in Figure 5. The macroscopic analysis demonstrated granules of different sizes, arranged in mono, double or triple layer along the thickness of the defect, interspersed and surrounded by gelatinous and transparent newly formed tissue. The GC defect was filled only by a thin sheet of newly formed tissue with a thickness less than that of the remaining bone and firmly adhered to the edges of the defect. In the groups that received implants different amounts of granules from the biomaterial were observed outside the borders of the bone defect, and considerably more for the W20/TCP80 group.

**Figure 5:** Macroscopic aspects of the calvaria specimens of the groups under study.

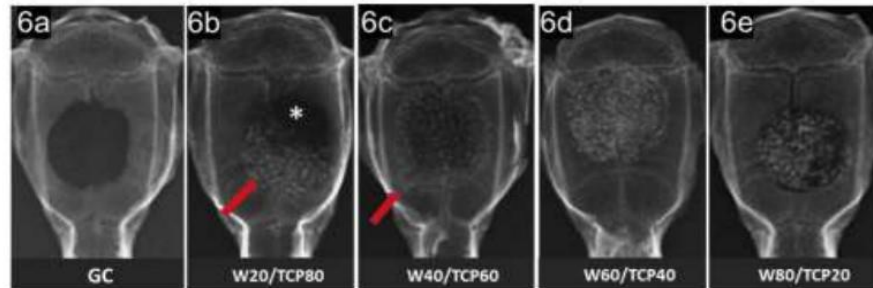


Note: (5a) GC with bone defect filled only by a tissue slide. (5b) Greater displacement of the granules observed (arrow) in the W20/TCP80 group. (5c and 5d) Biomaterial granules interspersed and surrounded by gelatinous substance filling all bone defects. (5e) The W80/TCP20 group exhibiting reduction of granules, compatible with the higher proportion of W.  
 Source: Created by the authors (2021).

In the radiographic analysis the images demonstrate the permanence of the critical bone defect in the CG with precise limits and the absence of the characteristic radiographic density of the bone tissue. In groups with implants the images show granules with a density greater than the adjacent bone and different patterns of displacement out of the bone defect. In groups W40/TCP60, W60/TCP40 and W80/TCP20 it is possible to confirm less displacement of the granules and adequate filling of the bone defect evidenced by the overlapping of the radiographic density of the granules at the implant site. However, for the W20/TCP80 group, the radiographs showed considerable displacement of the granules from the biomaterial, evidenced by the radiographic density of the granules outside the area of the bone defect, with the presence of hypodensity corresponding to the failure of filling the model with the biomaterial (Figure 6).



**Figure 6:** Representative radiographic images for the study groups.



Note: (6a) Aspects of the critical bone defect in the calvaria of the CG. (6b) For the W20/TCP80 group, the arrow indicates undesirable displacement of the biomaterial, which resulted in filling failure (asterisk). (6c) In the W40/TCP60 group, there was displacement of the granules (arrow), however, with the bone defect being filled in a desirable way with the biomaterial. (6d) Group W60/TCP40 exhibited less displacement of the granules and excellent filling. (6e) Group W80/TCP20 with desirable filling of the bone defect. It is possible to observe reduction of the granules.

Source: Created by the authors (2021).

#### 4. Discussion

The experimental groups in the present study tolerated the surgical procedure well, together with the implantation of different percentage compositions of W%/TCP% of the biomaterial. The analysis of a biomaterial based on TCP by Souza, *et al.* (2020), reinforced with 10% W, performed in a rat calvaria bone defect model, concluded that the biomaterial was shown to be biocompatible, non-cytotoxic, resorbable and capable of inducing new bone formation. In this study, the inflammatory phase occurred in a similar way for most animals in the study groups, with the lack of inflammatory signals demonstrating biocompatibility. In addition, no signs of infection were observed during the analysis period which can be attributed to maintaining the aseptic chain during the surgical process and adequate sterilization of the biomaterial by dry heat.

Barbosa, *et al.* (2019), in a study with rabbits, evaluated implants in of bone model defects in tibias, which received scaffolds developed with a composition of 40% TCP and 60% W. This study concluded that the animals did not show clinical signs of implant rejection and went through the post period -surgical without signs of toxicity of the biomaterial. In this study with rats, the experimental groups showed similar clinical results, no moderate or severe pain, no signs of exaggerated inflammatory response or infection, and it is possible to state that the different proportions show good biocompatibility and biological safety.

According to Spicer, *et al.*, (2013), the experimental model using a rat calvaria critical bone defect presents major obstacle to spontaneous bone regeneration due to its morphology, and a reduced source of osteoprogenitor cells. and Gomes and Fernandes (2011) the experimental model using a rat calvaria critical bone defect presents major obstacle to spontaneous bone regeneration due to its morphology, and a reduced source of osteoprogenitor cells. In this sense, the characteristics of the biomaterial studied such as the size and shape of the granules, allowed the complete filling of the bone defect model, providing a means for cell migration.

The retention and disposition of the biomaterial in the implanted location is influenced by the properties of its micro and macrostructure. Therefore, the size, shape and surface area of the granules determine the surface energy, cellular interactivity, and repulsion force between the particles (Zhao, *et al.*, 2007). In this study, it was observed that the size and shape of the granules of the biomaterial provided adequate arrangement and permanence in the intergranular space. Such characteristics favor the diffusion of nutrients and growth factors which together with angiogenesis are essential to the cellular activities observed during tissue repair (Bouler, 2017).

Regarding surface energy, when hydrated with 0.9% SF at room temperature, the granules of the proportions W40/TCP60, W60/TCP40 and W80/TCP20 showed greater hydrophilicity however the proportion W20/TCP80 is less hydrophilic. It is known that the free surface energy determines whether a biomaterial is hydrophilic or hydrophobic, directly influencing its wettability. Research such as the study by Nakamura, *et al.* (2015), demonstrates the importance of the wettability of ceramic-type biomaterials, in which the authors used polarization treatment to increase the electrical charges on the surface of biomaterials including hydroxyapatite, calcium and beta tricalcium phosphate. It was found that the increase in free electrical charges on the surfaces resulted in better surface wettability performance related to better performance for osteoconductivity. Other studies (Khaskhoussi, *et al.*, 2019; Pires, 2020) have evaluated ceramic composites and concluded that wettability is related to the high osteointegration capacity of these materials.

In the present study the compositions implanted in the groups W40/TCP60, W60/TCP40 and W80/TCP20 showed greater hydrophilicity behavior. The compositions formed aggregates that allowed easier handling, implantation, and greater permanence of the biomaterial granules in the receiving bed resulting in complete filling of the critical bone defect model. The composition implanted in the W20/TCP80 group showed little hydrophilic behavior with the granules remaining dispersed in the liquid which hindered its handling and implantation in the model. This resulted in a greater displacement of the biomaterial out of the bone defect and causing failure of filling of the recipient bed.

In the application of a critical bone model defect in rat calvaria these findings are relevant. The granules of the biomaterial based on W%/TCP% must fill the model uniformly, such that the mineral phase W provides structural reinforcement and bioactive ions through their dissolution in biological fluids. The TCP mineral phase, which has biodegradation and slower resorption rates, serves as a framework favoring osteoconductivity (Almeida, *et al.*, 2020; Palakurthy and Samudrala, 2019).

## 5. Conclusion

Clinical, macroscopic and radiographic characteristics confirmed that all study groups tolerated the implantation of the biomaterial well and the different proportions of W%/TCP% demonstrated biocompatibility. The physical requirements in the shape and size of the granules enabled to satisfactory filling of the bone defect all groups however the less hydrophilic behavior of the W20/TCP80 group resulted in greater difficulty in handling and greater displacement of the granules after implantation. The increased hydrophilic behavior of the W40/TCP60, W60/TCP40 and W80/TCP20 groups favored the application in the experimental model *in vivo*.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the Research Support Foundation of the State of Bahia – FAPESB, the Institute for Ceramics and Glass in Madrid Spain. The Materials Characterization Laboratory, The Radiological Physics Laboratory, and the Department Health Technology and Biology - DTSBio of the Federal Institute of Education, Science and Technology of Bahia - IFBA. Special thanks also to Professor Fabiana Pain Rosa.

## References

- Tanner, K. E. (2017). Hard tissue applications of biocomposites. Editor: Luigi Ambrosio, In *Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Biomedical Composites* (Second Edition), 37-58.
- De Santis, R., Guarino, V., & Ambrosio, L. Composite biomaterials for bone repair. Editor(s): Kendell M. P., Josep A. P., In *Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Bone Repair Biomaterials* (Second Edition), Woodhead Publishing, 2019, Pages 273-299.



- Ke, X., Zhuang, Z., Yang, X., Fu, J., Xu, S., Xie, L., Gou, Z., & Yang, G. (2017). Enhancing the Osteogenic Capability of Core–Shell Bilayered Bioceramic Microspheres with Adjustable Biodegradation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017:9(29).
- Canillas, M., Pena, P., De Aza, A. H., & Rodríguez, M. A. (2017). Calcium phosphates for biomedical applications. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 56, 91-112.
- Grandi, G., Heitz, C., Dos Santos, L. A., Silva, M. L., Sant'Ana Filho, M., Pagnocelli, R. M., & Silva, D. N. (2011). Comparative histomorphometric analysis between  $\alpha$ -Tcp cement and  $\beta$ -Tcp/Ha granules in the bone repair of rat calvaria. *Materials Research*, 14, 11-16.
- De Souza, A. C., McNulty, C., Camilli, J. Â., Bertran, C. A., & De Souza, M. M. Calcium Phosphate Cement Plus 10% Wollastonite Whiskers: An In Vivo Study. *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering*, 47, 117–126.
- Bagherifard, A., Yekta, H. J., Aghdam, H. A., Motififard, M., Sanatizadeh, E., Nejad, M. G., Esmaeili, S., & Khandan, A. (2020). Improvement in osseointegration of tricalcium phosphate-zircon for orthopedic applications: an in vitro and in vivo evaluation. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 58, 1681–1693.
- Schmitz, J. P., Schwartz Z., Hollinger, J. O., & Boyan, B. D. (1980). Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anatomica*, 138:185–192.
- Takagi, K., & Urist, M. R. (1982). The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Annals of Surgery*. 196, 100–109.
- Accorsi-Mendonça, T., Zambuzzi, W. F., Bramante, C. M., Cestari, T. M., Taga, R., Sader, M., de Almeida Soares, G. D., & Granjeiro, J.M. (2011). Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical size calvarial defects. *The Journal of Materials Science*, 22, 997-1004, 2011.
- National Academy of Sciences. (2011). Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth edition. Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. Institute for laboratory animal research. 2011.
- Spicer, P. P., Kretlow, J. D., Young, S., Jansen, J. H., Kasper, F., K., & Mikos, A. G. (2012). Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature Protocol*, 7, 1918–1929.
- Sotocina, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., Mapplebeck, J. C. S., & Zhang, S. (2011). The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain*, 7, 1744–8069.
- Barbosa, W. T., de Almeida, K. V., de Lima, G. G., Rodriguez, M. A., Lia Fook, M. V., Garcia-Carrodeguas, R., Silva Junior, V. A., & de Sá, M. J. C. (2019). Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ $\beta$ -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 108(3): 1107-1116, 2020.
- Bouler, J. M., Pilet, P., Gauthier, O., & Verron, E. (2017). Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomaterialia*, 53, 1-12
- Nakamura, M., Hori, N., Namba, S., Toyama, T., Nishimiya, N., & Yamashita, k. (2015). Wettability and surface free energy of polarised ceramic biomaterials. *Biomedical materials*, 10(1):011001.
- Khaskhoussi, A., Calabrese, L., Currò, M., Ientile, R., Bouaziz, J., & Proverbio, E. (2020). Effect of the Compositions on the Biocompatibility of New Alumina-Zirconia-Titania Dental Ceramic Composites. *Materials*, 13(6):1374.
- Almeida, R. S., Prado da Silva, M. H., Navarro da Rocha, D., Ribeiro, I. I. A., Barbosa Júnior, A. A., Miguel, F. B., & Rosa, F. P. (2020). Regeneração de defeito ósseo crítico após implantação de fosfato de cálcio bifásico ( $\beta$ -fosfato
- de Oliveira, R. C. e Borges, A. F. S. B. (2020). Wettability and pre-osteoblastic behavior evaluations of a dense bovine hydroxyapatite tricálcico/pirofosfato de cálcio) e vidro bioativo fosfatado. *Cerâmica*, 66, 119-125.
- Palakurthy, S., Reddy, V. G. K., Samudrala, R. K., & Azeem, A. P. (2019). In vitro bioactivity and degradation behaviour of  $\beta$ -wollastonite derived from natural waste. *Materials Science and Engineering C*. 98:109-117.
- Pires, L. A., de Meira, C. R., Tokuhara, C. K., de Oliveira, F. A., Dainezi, V. B., Zardin, M. S. G., Fortulan, C. A., ceramics. *Journal of Oral Science*. 62. 259- 264.

## 7.2 ARTIGO 2: Raman spectroscopy analysis of wollastonite/TCP glass-ceramics after implantation in critical bone defect in rats

Mauricio Mitsuo Monção<sup>1,2\*</sup>, Isabela Cerqueira Barreto<sup>2</sup>, Fúlvio Borges Miguel<sup>2</sup>, Luiz Fernando Cappa de Oliveira<sup>3</sup>, Raul Garcia Carrodeguas<sup>4</sup>, Roberto Paulo Correia de Araújo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Technology in Health and Biology, Federal Institute of Education, Science and Technology of Bahia, Salvador, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Tissue Bioengineering and Biomaterials, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil.

<sup>3</sup>Nucleus for Spectroscopy and Molecular Structure, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil.

<sup>4</sup>Noricum SL, San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain.

<sup>5</sup>Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil.

\*Email: maurimitsuo@yahoo.com.br

### Abstract

In this work wollastonite/tricalcium phosphate (W/TCP) glass-ceramics with three W/TCP weight ratios (20/80; 60/40 and 80/20) were implanted in rat calvaria and the modifications taking place during implantation were studied by Raman spectroscopy. The experimental glass ceramics were composed of different contents of  $\beta$ W,  $\alpha$ W,  $\beta$ TCP,  $\alpha$ TCP and glassy phases. Materials were implanted for 7-, 15-, 45- and 120-day periods after which the implanted materials were recovered and analyzed by FT-Raman spectroscopy. The results suggested that the  $\alpha$ W phase reabsorbs fast during implantation in the glass-ceramics 60/40 and 80/20, whereas  $\beta$ TCP and  $\alpha$ TCP glass-ceramic are gradually attenuated and replaced by biological apatite-like bands. In the glass-ceramic 20/80, the bands related to  $\beta$ TCP phase remained unvaried in all analyzed periods. New bands associated to the deposition of collagenous material appeared during implantation for all 60/40 and 80/20 glass-ceramics experimental groups, but important differences in intensities between both groups. The spectra corresponding to implants of 60/40 glass-ceramic at the 120-day period were very similar to those of the control group (normal cortical bone), with regards to Raman shifts and intensities, as well as in the FWHM value of the  $962\text{ cm}^{-1}$  apatite band ( $\nu_1\text{ PO}_4$  in hydroxyapatite), evidencing that apatite deposited at the implant site has the same crystallinity than biological apatite in normal bone mineral. The glass-ceramic 20/80 behaved just as an osteoconductive filling material, while glass-ceramics 60/40 and 80/20 were able to induce deposition of organic matrix mineralized new tissue. The 60/40 glass-ceramic showed the best performance, and the most similar Raman spectrum to normal cortical bone.

**Keywords:** Raman Spectroscopy, Glass-ceramics, Wollastonite, Tricalcium Phosphate

### 1. Introduction

The treatment of pathologic or traumatic extensive bone losses requires the application of bone substitutes since the natural physiological bone healing mechanism is insufficient to reach total bone tissue regeneration in a short time [1]. Currently, all the known materials used as bone substitutes still have some limitations and the search for the ideal bone substitute continues

[2]. Several synthetic materials have been proposed for bone regeneration, among them, those consisting of several components that contribute with properties to render enhanced osteoinduction and osseointegration are attracting considerable attention [3].

Glass-ceramics belonging to the binary system wollastonite-tricalcium phosphate (W/TCP) [3] has been extensively studied in the last two decades as they exhibit greater bioactivity and better mechanical resistance than the well-known calcium phosphate bioceramics [4] [5] [6] [7] [8]. The *in vitro* and *in vivo* bioactivity of W and its potential in bone regeneration have been well established in many published and explained on the basis of its incongruent dissolution and the calcium and silicon ions released when in contact with physiological fluids [9]. In particular, the silicon ion has a well-recognized capacity to induce osteogenesis and angiogenesis [9] [10]. Furthermore, the addition of W to calcium phosphates to manufacture sintered composites contributes to reinforce and densify the resulting glass-ceramic and to improve its bioactivity [10].

Calcium phosphates are similar to the mineral phase of bone matrix, teeth, and calcified tissues. TCP is one of the most utilized calcium phosphates as bone substitute, due to its partial biodegradability, osteoconductivity and bone adhesion. Such properties result in its wide clinical use, as well as its application in the development of new composites with the purpose of bone regeneration [11][12][13].

Thus, combining the properties of W and TCP in the form of sintered glass-ceramic with different W/TCP ratios for the sake of increased osteoinduction and resorption may result in a bone substitute with better properties than its components. Moreover, the use of different W/TCP weight ratios may be a good strategy to tune the *in vivo* resorption rate of W/TCP glass-ceramics [14][15]. The ideal amount of each component in the glass-ceramic becomes a challenge in the quest for the better performance of the material in the host organism, which is necessary to evaluate by *in vivo* implantation models.

Among the various techniques available, Raman spectroscopy has been widely used in the characterization of glasses and ceramics as well as in the assessment of *in vivo* responses to bone regeneration materials [16] [17] [18] [19]. It is a non-destructive technique requiring none or little preparation of samples and is widely used in molecular and structural analysis of complex compounds. This technique is based on inelastic scattering of monochromatic light by the sample and the analysis of the frequency shift of the scattered light, which provides information about vibrational, rotational and other low frequency transitions in molecules or

crystals [20] [21] [22] [23].

In this scenario, this work studied the compositional modifications of W/TCP glass-ceramics with different W/TCP weight ratios after implantation in a critical bone defect model in rats for several periods, using Raman spectroscopy, and describes the ability of the studied glass-ceramics to induce formation of organic matrix and mineralization of newly formed tissue, aiming to identify the best performance during the bone regeneration.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Glass-ceramics

Experimental W/TCP glass-ceramics (W/TCP weight ratios: 80/20, 60/40 and 20/80) were kindly supplied by the Institute of Ceramics and Glass (ICV-CSIC, Madrid, Spain).

They were manufactured from powders of natural wollastonite,  $\text{CaSiO}_3$  (NYCO, NYAD M1250, Batch Number M1404227J01) and tricalcium phosphate,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Sigma-Aldrich, Ref. 21218, Batch Number BCBM7330V). Briefly, the required amounts of both raw materials were mixed with isopropanol and the mixture was ball milled in attrition mill. The resulting slurry was dried at 60 °C overnight and the dry cake was sintered at the selected temperature and dwelling time (20-80: 3 hr. at 1250 °C; 60-40: 1 hr. at 1250 °C; and 80-20 = 5 min. at 1250 °C). The sintered cakes were crushed in jaw mill and sieved to collect particles with size in the range 0.6-0.4 mm.

Granulate 60/40 was received sterile (25 kGy, e-beam) whereas 20/80 and 80/20 granulates were received non-sterile and sterilized by dry heat (180°C, 30 min) prior to be used.

The 20-80 granules consisted mainly of crystalline  $\beta$  and  $\alpha$ TCP and  $\beta$ W, in this order of abundance, and minor amounts of crystalline  $\alpha$ W and amorphous glassy phase (AGP). On the other hand, 60/40 and 80/20 granules were composed of crystalline  $\alpha$ W and  $\beta$ TCP and AGP. The chemical and phase compositions of the experimental materials are resumed in Table 1.

Table 1. Chemical and phase compositions of the experimental glass-ceramics.

W-TCP Glass- ceramics	Oxides composition (wt.%)				Phase composition <sup>a</sup>				
	CaO	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Others <sub>b</sub>	$\alpha$ W	$\beta$ W	$\beta$ TCP	$\alpha$ TCP	AGP <sup>c</sup>
20/80	52.6	10.5	36.7	0.2	+	-	+++	++	-
60/40	49.2	31.5	18.4	0.9	++	nd <sup>c</sup>	++	nd	+++
80/20	47.6	42.1	9.2	1.1	++	nd	+	nd	+++

a. Semi-quantitative scale: +++ Most abundant phase; ++ Abundant; + Minor; - Scarce.

b. Trace impurities as MgO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>O, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>

c. nd: non detected; AGP.: amorphous glassy phase

## 2.2. Animal model and implantation procedure

The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Bahia, Brazil, (No. 128/2017), and followed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the National Academy of Sciences [24], as well as the norms of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). Seventy-two adult male rats (*Rattus norvegicus*) weighing 350-400 g and 4-5-month age were used. Animals were kept in individual cages at a temperature of 22 °C ( $\pm 2$ ) exposed to alternating periods of 12 hr. light and 12 hr. dark and fed and watered *ad libitum*. Animals were randomly distributed into experimental 4 groups (n=20 each): three groups underwent surgery to create a circular bone defect of 8 mm in diameter in the central portion of the calvaria which was filled with one of the experimental glass-ceramics 20/80, 60/40, and 80/20. The fourth group (CG) did not undergo surgery and was used as control to establish the spectroscopic parameters of the normal cortical bone of the calvaria.

Inside each group, subgroups (n=5) were sacrificed after implantation periods of 7, 15, 45 and 120 days. The calvarias were removed, dissected, and fixed in 10 % formaldehyde (v/v) at 4-8 °C. Fixed samples were then prepared according to Meade *et al* [25], this is, were removed from the fixing solution, washed in filtered water, and immersed in 0.9% saline solution for ten minutes, then removed and dried with a paper towel. The experimental design is shown in Figure 1.

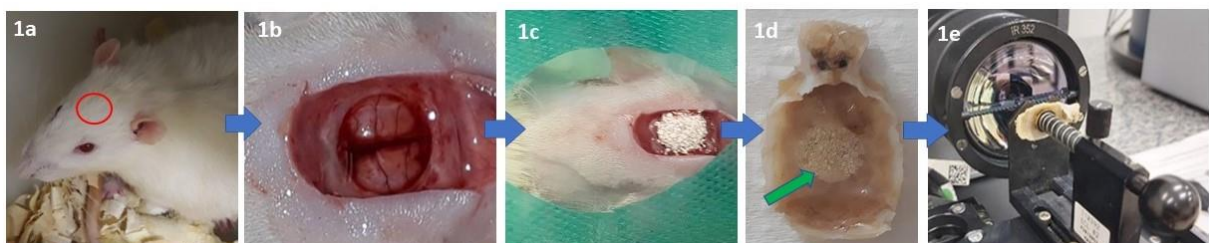


Figure 1. Experimental design: 1a.- Site where defect surgery was practiced; 1b.- Aspect of the critical size bone defect (8 mm); 1c.- Defect filled with experimental glass-ceramic; 1d.- Calvaria specimen with the implant site at the central portion (green arrow); and 1e.- Position of sample in the FT-Raman instrument.

## 2.3. Raman spectroscopic analysis

A FT-Raman Spectrophotometer RFS 100/S (Bruker, Germany) with YAG:Nd laser (1064 nm) excitation source and Ge-diode, cooled at liquid N<sub>2</sub> temperature was used. Sample was directly positioned in the sample holder with the laser beam adjusted to a power of 10 mW and focused on the central portion. Spectra in the region 300-3500 cm<sup>-1</sup> were obtained with a

resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  and accumulation of 512 scans. These parameters were obtained from previous experiments to obtain the maximum signal-to-noise ratio without altering the physical and chemical integrity of samples. OPUS 6.0 software (Bruker, Germany) was used to acquire and process Raman data, and all spectra were obtained at least three times, after focusing the laser beam at a different point on the sample, to verify the reproducibility of the system and possible uncertainties in intensity or Raman shift of the vibrational bands observed. GRAMS/AI 7.02 software package (Thermo Galactic, USA) was used for import/export of Bruker OPUS File Format data and conversion to ASCII-XY. The spectra were plotted in OriginLab® version 2020b program, and analyzed for the presence, position, width, and intensities of the Raman bands. The spectra of the glass-ceramics, as received, and after the different implantation periods were analyzed to identify the modifications associated to resorption or permanence of the constituting crystalline phases, or the deposition of new organic or inorganic substances related to new bone tissue formation at the implant site. The assignation of the bands observed in the experimental spectra was carried out on the basis of the phase composition of the experimental glass-ceramics of Table 1 and the data published in literature [26] [27] [28] [29] [30] [30].

### 3. Results

The spectra of the group 20/80 after the different periods of implantation is displayed in Figure 2. After 7, 15 and 45 days the characteristic Raman bands of  $\alpha$ W,  $\beta$ - and  $\alpha$ TCP phases were still distinguishable. Additionally, new bands arose at  $1668$ ,  $1450$  and  $879\text{ cm}^{-1}$  with very weak intensities during implantation. At 120-day period, the characteristic bands of the  $\beta$ TCP phase remain but those corresponding to  $\alpha$ W ( $580$  and  $374\text{ cm}^{-1}$ ) are no longer observed [19] [27].

The results for the 60/40 and 80/20 experimental groups are shown in Figure 3 and Figure 4, respectively. In these experimental groups bands at  $1668\text{ cm}^{-1}$  (amide I);  $1452\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  and  $\text{CH}_3$  lipids/collagen);  $1271$  and  $1248\text{ cm}^{-1}$  (amide III);  $1005\text{ cm}^{-1}$  (phenylalanine);  $877$ ,  $856$  and  $818\text{ cm}^{-1}$  (proline, hydroxyproline and tyrosine), all consistent with the deposition of collagen on the implant site, were observed [32].

These groups also showed spectral modifications around  $1072$ ,  $592$  and  $432\text{ cm}^{-1}$ , consisting of the appearance of bands with significant intensity differences between groups. From the 7-day period the main bands attributed to the  $\alpha$ W mineral phase ( $1076$ ,  $985$ ,  $580$  and  $374\text{ cm}^{-1}$ ) [19] [26] [28] are no longer detected, suggesting that it is quickly resorbed in the physiological



environment.

On the other hand, the most prominent bands attributed to  $\beta$ TCP and  $\alpha$ TCP phases (974 and 957  $\text{cm}^{-1}$ , respectively) are observed up to the 45-day period. At 120-day period, 60/40 and 80/20 groups presented a unique band centered at 962  $\text{cm}^{-1}$ . Only in the 80/20 group was visible a low intensity shoulder at 972  $\text{cm}^{-1}$  due to a small amount of  $\beta$ TCP remaining [19] [29] [30] [31].

In the 20/80 group, after implantation for 120 days, only a few bands associated with the deposition of organic components at the implant site were observed, whereas the bands attributed to the inorganic constituents of the glass-ceramic remained.

Groups 60/40 and 80/20 presented bands with similar at very similar Raman shifts, but with significant differences in their intensity's ratios.

#### 4. Discussion

The results of this study suggest that the experimental materials studied, i.e., W/TCP glass-ceramics with nominal weight ratios of 20/80, 60/40 and 80/20, exhibit quite different behavior with respect to resorption and new bone tissue deposition when implanted in rat calvaria.

The Raman vibrational profiles of the studied glass-ceramics experienced drastic modifications with the implantation time evidencing partial resorption of the inorganic constituents of the implanted material and the simultaneous deposition of organic and inorganic substances consistent with the formation of new bone tissue at the implant site.

The modifications in Raman shift, width and intensity of bands were dependent of the implantation period, and permit monitoring the resorption of the different crystalline phases constituting the glass-ceramics as well as the deposition and formation of new substances both organic and inorganic.

Results indicated that the composition of 20/80 glass-ceramic remained almost unvaried up to the 45-day period; only after 120 days the bands assigned to the  $\alpha$ W disappeared. This suggests that the resorption rate of the 20/80 glass-ceramic is low and probably insufficient for bone regeneration purposes, keeping in mind that an ideal bone substitute should be resorbed and replaced by new bone tissue in a simultaneous and coordinated process [33]. However, results indicate that it can be used as an osteoconductive filling material for repairing bone defects.

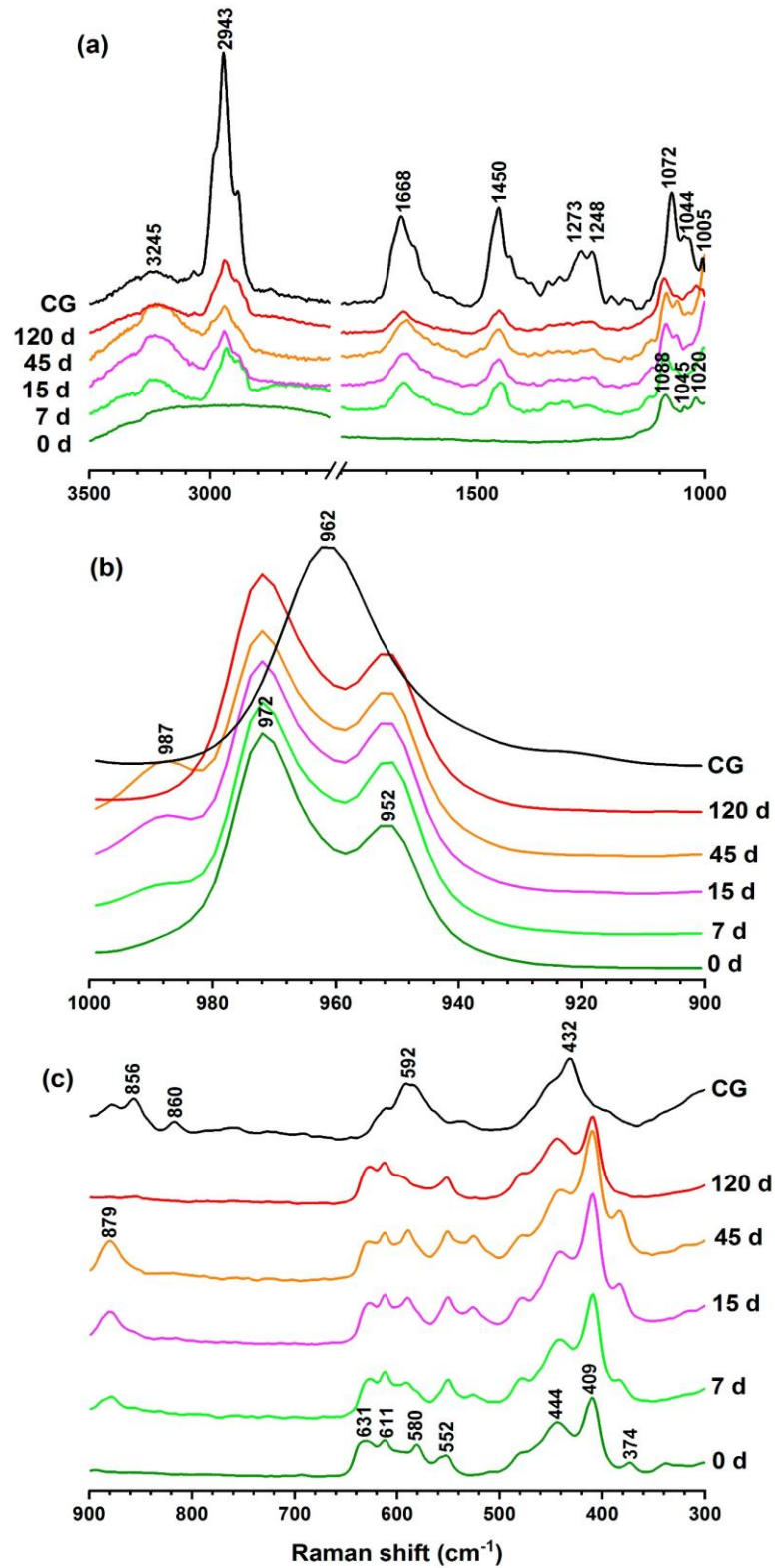


Figure 2. Raman spectra of 20/80 glass-ceramic: before (0 d) and after implantation for 7-, 15-, 45-, and 120-day periods, and the spectrum of non-implanted rat calvaria (CG). (a) Wavenumber range 3500-1000 cm<sup>-1</sup>; (b) 1000-900 cm<sup>-1</sup>; (c) 900-300 cm<sup>-1</sup>.



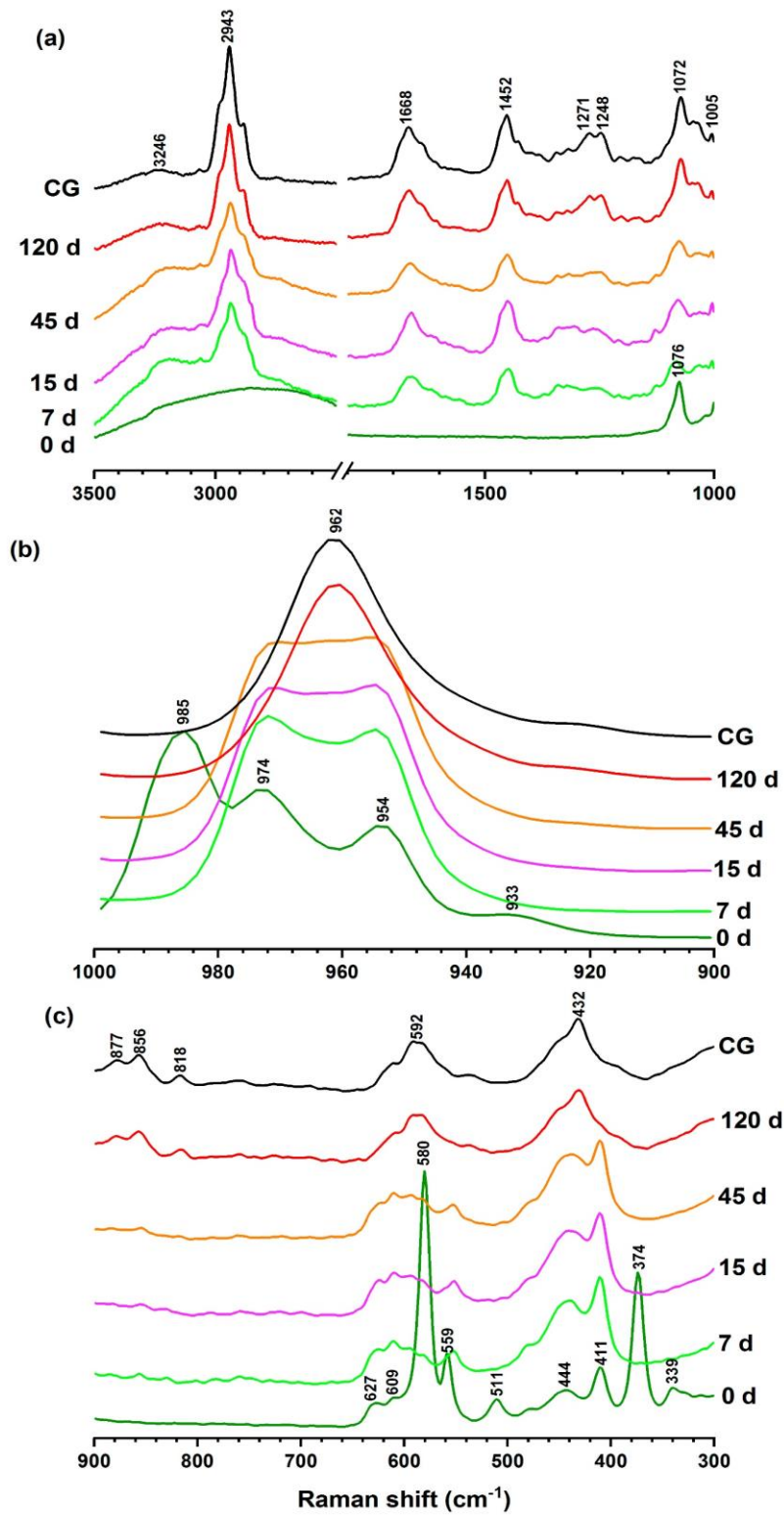


Figure 3. Raman spectra of 60/40 glass-ceramic: before (0 d) and after implantation for 7-, 15-, 45-, and 120-day periods, and the spectrum of non-implanted rat calvaria (CG). (a) Wavenumber range 3500-1000  $\text{cm}^{-1}$ ; (b) 1000-900  $\text{cm}^{-1}$ ; (c) 900-300  $\text{cm}^{-1}$ .

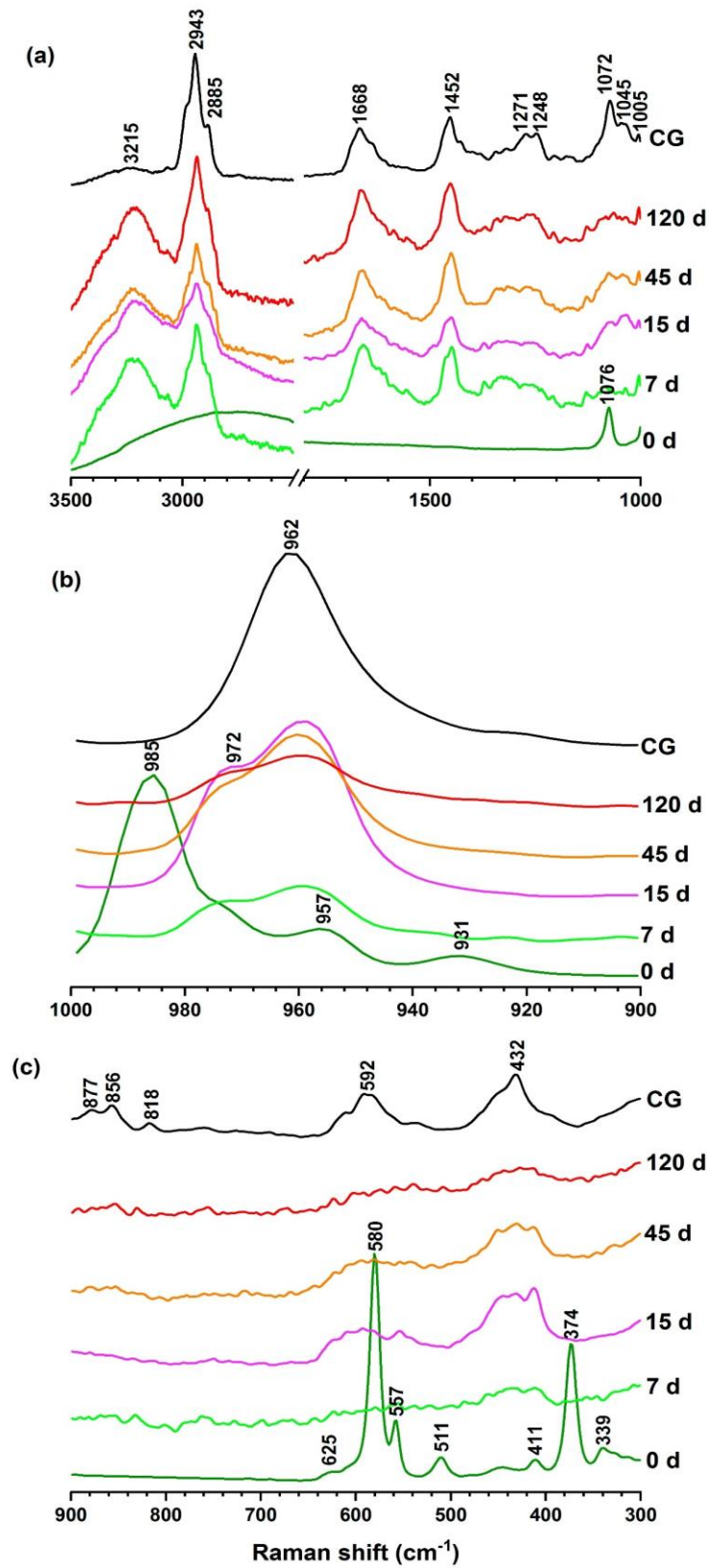


Figure 4. Raman spectra of 80/20 glass-ceramic: before (0 d) and after implantation for 7-, 15-, 45-, and 120-day periods, and the spectrum of non-implanted rat calvaria (CG). (a) Wavenumber range 3500-1000  $\text{cm}^{-1}$ ; (b) 1000-900  $\text{cm}^{-1}$ ; (c) 900-300  $\text{cm}^{-1}$ .

Results indicated that the  $\alpha$ W phase at the 7-day period of implantation of glass-ceramics was completely resorbed in groups 60/40 and 80/20, as evidenced the absence of the characteristic bands at 1076, 985, 933, 931, 580, 559, 557 and 511  $\text{cm}^{-1}$  [19] [26] [27] [28]. These results corroborate the results of previous studies that evaluated the behavior of ceramics containing  $\alpha$ W and TCP, both *in vitro* and *in vivo* and reported its fast and incongruent dissolution and the pseudomorphic transformation of the TCP phase into biological apatite (Ap) [9].

Other study used wollastonite as bioactive, resorbable, and reinforcing filler in a W/polyvinyl alcohol composite for bone regeneration and concluded that it was possible to obtain controlled biodegradation and induce the formation of apatite on the material surface after 7 days of immersion in simulated body fluid [34]. Others also demonstrated that the presence of W in composites enhanced bioresorption rates and favored the initial bone repair dynamics [35] [36] [37] [38].

Considering the high *in vivo* resorption rate of  $\alpha$ W it is reasonable to consider that different amounts of Ca and Si ions are released from the experimental materials used in this study which should be proportional to the  $\alpha$ W content. The amount of surface amorphous silica and Ap nucleation on the implanted glass-ceramic should be dependent of its  $\alpha$ W content as well [9] [39]. It is well known that calcium and silicon ions play an important in angiogenesis and osteogenesis *in vivo* [40] [41] [42].

Glass-ceramics with osteogenic behavior should primarily influence the local cell metabolism to promote cell differentiation into osteoblasts and stimulate their proliferation, with subsequent production of sufficient new bone tissue to fill the critical bone defect. Filho *et al.* [42] used Raman spectroscopy to study *in vivo* ceramic implants and found that those that induced the higher amounts of organic matrix deposition also achieved higher mineralization and new bone formation.

The results of the present study showed different spectral behavior for the formation of Raman bands around 1668  $\text{cm}^{-1}$  (amide I), 1454  $\text{cm}^{-1}$  (methyl group), 1269 and 1247  $\text{cm}^{-1}$  (amide II), 1005  $\text{cm}^{-1}$  (phenylalanine), 877, 856 and 818  $\text{cm}^{-1}$  (proline, hydroxyproline and tyrosine) characteristic of collagen, as reported in studies that evaluated bone repair through Raman spectroscopy [43] [44] [45]. It is understood that the different percentage proportions of  $\alpha$ W in glass-ceramics were decisive for the formation of organic components with extremes (20/80 and 80/20) exhibiting lower performances, and the 60/40 showing better

performance, as resumed in Figure 5.

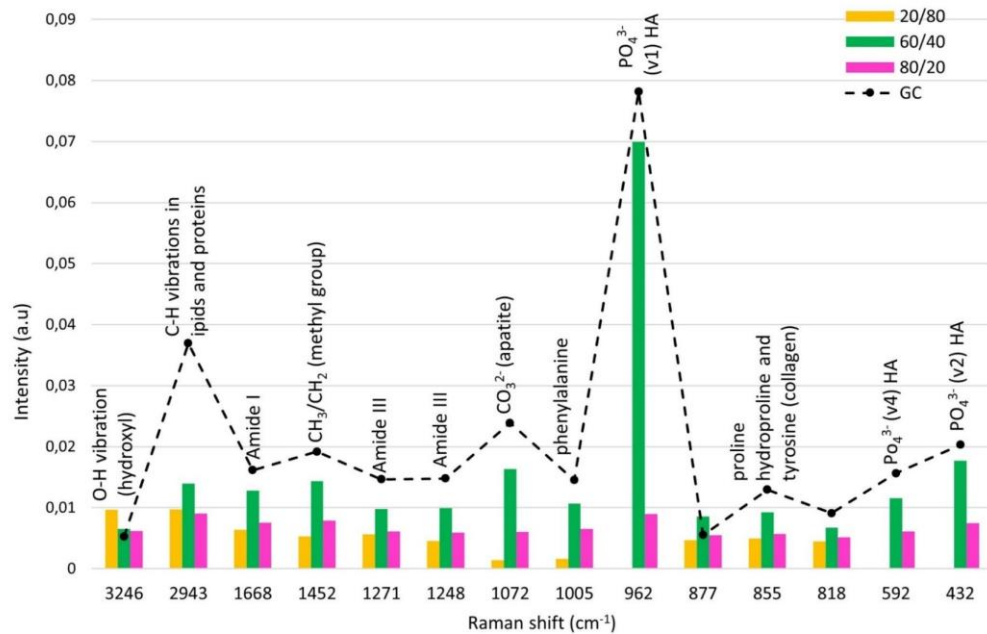


Figure 5. Raman band intensities reached by the experimental groups at 120 days after glass-ceramic implantation and comparison with CG.

Although the literature does not define the ideal amount for silicon ion saturation and osteogenesis promotion, it is reasonable to infer that the amount of silicon ions released through  $\alpha$ W resorption influences the osteogenesis potential of glass-ceramics under study. Uribe *et al.* [46] investigated the *in vitro* osteogenic effects of dental follicle stem cells in simulated body fluid containing different Si concentrations and concluded that 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Si had significant positive effect on osteogenesis. On the other hand, solutions with Si < 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and > 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  did not show significant effects, whereas concentrations  $\geq 100 \mu\text{g}/\text{mL}$  had an inhibitory effect on osteogenesis. Such findings corroborate the results of the present study, and permit to explain the lower deposition of organic matter on glass-ceramics with extreme contents of  $\alpha$ W (20/80 and 80/20) and expect a poorer performance for bone regeneration as well.

However, dos Santos *et al.* [47] found better results for bone regeneration using a 3D scaffold made of glass-ceramic of W/TCP with weight ratio of 20/80 evidencing that, besides chemical composition, biomaterial porosity (proportional to the material/body contact area) exerts decisive influence on the interaction with the host organism. The group 60/40 showed formation of characteristic bands of organic components and achieved great spectral similarity with CG. In the present study, the positions, and intensities of bands such as those

observed in CG indicate the formation and organization of a new tissue with characteristics similar to the normal cortical bone [18].

Regarding the compositional modifications associated with mineral polymorphs, the spectral results of the group 20/80 group demonstrated the permanence of bands characteristic of the  $\beta$ - and  $\alpha$ -TCP phases throughout all analyzed periods. This indicates that the 20/80 glass-ceramic performed as an osteoconductive filling material in the critical bone defect model. Groups 60/40 and 80/20 also presented bands attributed to  $\beta$ - and  $\alpha$ -TCP phases (972 and 957  $\text{cm}^{-1}$ , respectively), but only up to the 45-day period. After 120 days of implantation, only the 972  $\text{cm}^{-1}$  band was visible in the 80/20 group as a shoulder of weak intensity, indicating slower biodegradation rate of  $\beta$ - with regard to  $\alpha$ -TCP. It is known that  $\beta$ -TCP and  $\alpha$ -TCP mineral phases are isomorphs with the same chemical composition; however, their differences in crystal structures promote different *in vivo* behaviors [9]. Thus, the results found corroborate other studies that verified that the solubility index of the  $\beta$ -phase was lower than that of the  $\alpha$ -TCP phase resulting in longer permanence of  $\beta$ -TCP at the implant site [48] [49] [50].

The results obtained also showed that in 60/40 and 80/20 groups, there were spectral changes consisting of the appearing of new bands characteristics of vibrational modes of the  $\text{PO}_4$  group. The Raman shifts observed (962, 586 and 428  $\text{cm}^{-1}$ ) are characteristic of the Ap composing bone mineral [32]; however, these bands presented important differences in intensities between the experimental groups. The intensities of these bands can be directly related to the osteogenic potentials of the glass-ceramics under study. It is understood that, among several factors, the intensities of Raman bands are also related to the amount of active molecular species present in the sample [51]. Therefore, the intensity of bands exhibited at the implant site can be related to components formed and/or deposited over the evaluated periods.

The mineralization quality achieved in 60/40 and 80/20 groups was evaluated by comparing the values of Full Width at Half Maximum (FWHM) in  $\text{cm}^{-1}$  for the Raman band centered at 962  $\text{cm}^{-1}$ , which is the more intense band in the Raman spectrum bone mineral phase, Ap. According to literature, the FWHM value of this band is inversely related to the crystallinity degree of Ap [52]. In our study, the comparison of FWHM values of the 962  $\text{cm}^{-1}$  band indicated different crystallinity degrees between experimental groups when compared to CG (Figure 6).

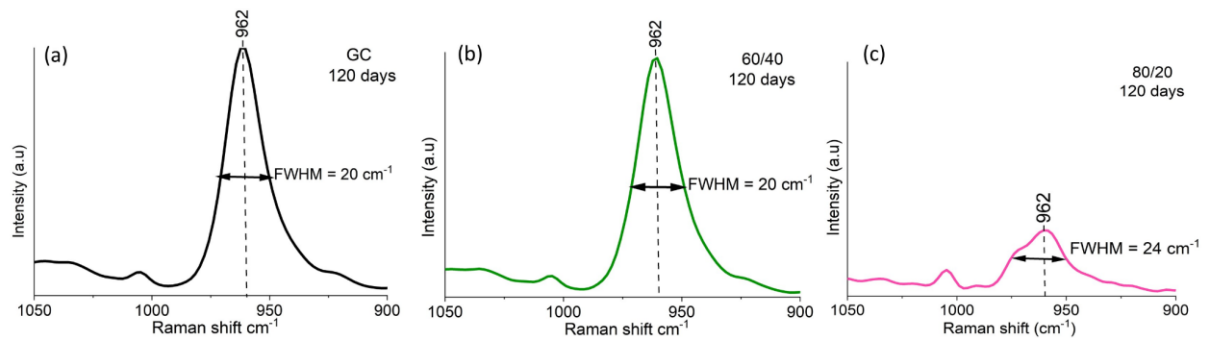


Figure 6. Comparison of FWHM of the  $962\text{ cm}^{-1}$  band at 120 days after the implantation of glass-ceramics. (a) Control group; (b) 60/40 group; (c) 80/20 group.

The group 80/20 showed higher FWHM than the groups 60/40 and CG. This indicates that 80/20 glass-ceramic induced the formation of poor crystalline Ap, probably because the fast dissolution of  $\alpha\text{W}$  obtained lower performance for the formation of organic components and mineralization of the newly formed tissue, and 60/40 resulted in greater amount and better organization of mineral components deposited and similarity to the spectrum of biological apatite in the CG. Results of this study showed that the 60/40 glass-ceramic presented the greatest potential for future clinical applications as bone regeneration material.

## 5. Conclusions

The spectral changes observed for 60/40 and 80/20 glass-ceramics demonstrated that they exhibited gradual biodegradation and compositional changes during the *in vivo* implantation periods studied, indicating they have osteogenic potential, mainly the 60/40, which achieved the greater spectral similarity with normal bone. During the analysis periods, 20/80 glass-ceramic showed scarce spectral changes which evidences lower *in vivo* reactivity and resorption, and a behavior typical of osteoconductive filling materials.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the Foundation for Research Support of the State of Bahia - FAPESB, the Department of Health Technology and Biology and the Laboratories of Materials Characterization, and of Radiological Physics of the Federal Institute of Education, Science and Technology of Bahia - IFBA. Special thanks to Professor Fabiana Paim Rosa. R.G.C. thanks grant PTQ-16-08573 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033, Spain.

## References

- [1] Sergi, R., Bellucci, D. and Cannillo, V. (2020) A Review of Bioactive Glass/Natural Polymer Composites: State of the Art. *Materials (Basel)*, 13(23), 5560. <https://doi.org/10.3390/ma13235560>
- [2] Pereira, H.F., Cengiz, I.F., Silva, F.S., Reis, R.L. and Oliveira, J. M. (2020). Scaffolds and coatings for bone regeneration. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 31(3), 27. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06364-y>
- [3] De Aza, P.N., Guitián, F. and De Aza, S. (1995) Phase Diagram of Wollastonite - Tricalcium Phosphate. *The Journal of the American Ceramic Society*, 78, 1653-1656. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1995.tb08865.x>
- [4] Magallanes-Perdomo, M., Luklinska, Z.B., Aza, A.H., Carrodegua, R.G., Aza, S.D. and Pena, P. (2011). Bone-like forming ability of apatite–wollastonite glass ceramic. *Journal of The European Ceramic Society*, 31, 1549-1561. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2011.03.007>
- [5] Gaspar, A.M.M., Saska, S., Carrodegua, R.G., De Aza, A.H., Pena, P., De Aza, P.N. and De Aza, S. Biological Response to Wollastonite Doped  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate Implants in Hard and Soft Tissues in Rats (2008) *Key Engineering Materials*, 396–398, 7-10. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.396-398.7>
- [6] Barbosa, W.T., De Almeida, K.V., De Lima, G.G., Rodriguez, M.A., Fook, M.V.L., Carrodegua, R.G., Silva Junior, V.A., De Sousa Segundo, F.A. and De Sá, M.J.C. (2019) Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ $\beta$ -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 108(6). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34462>
- [7] Sola, D. and Grima, L. (2018) Laser Machining and In Vitro Assessment of Wollastonite-Tricalcium Phosphate Eutectic Glasses and Glass-Ceramics. *Materials (Basel)*, 11, 125. <https://doi.org/10.3390/ma11010125>
- [8] Ros-Tárraga, P., Mazón, P., Revilla-Nuin, B., Rabadán-Ros, R., De Aza, P.N. and Meseguer-Olmo, L. (2020) High temperature  $\text{CaSiO}_3$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ceramic promotes osteogenic differentiation in adult human mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 107, 110355. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110355>
- [9] García Carrodegua, R., De Aza, P.N. (2011) Main Contributions to Bioceramics by Salvador De Aza. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.*, 50, 219-228. <https://doi.org/10.3989/cyv.392011>
- [10] Wang, C., Xue, Y., Lin, K., Lu, J., Chang, J., Sun, J. (2012) The enhancement of bone regeneration by a combination of osteoconductivity and osteostimulation using  $\beta$ - $\text{CaSiO}_3/\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  composite bioceramics. *Acta Biomater.* 8, 350-60. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.08.019>

- [11] Núñez-Rodríguez, L., Encinas-Romero, M., Gómez-Álvarez, A., Valenzuela-García, J. and Tiburcio Munive, G. (2018) Evaluation of Bioactive Properties of  $\alpha$  and  $\beta$  Wollastonite Bioceramics Soaked in a Simulated Body Fluid. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 9, 263-276. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2018.93015>
- [12] Jeong, J., Kim, J.H., Shim, J.H., Hwang, N.S. and Heo, C.Y. (2019) Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomaterials Research*, 9, 23:4. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0149-3>
- [13] Shim, K.S., Kim, H.J., Kim, S.E. and Park, K. (2018) Simple surface biofunctionalization of biphasic calcium phosphates for improving osteogenic activity and bone tissue regeneration. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 68, 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.07.048>
- [14] Safronova, T.V., Selezneva, I.I., Tikhonova, S.A., Kiselev, A.S., Davydova, G.A., Shatalova, T.B., Larionov, D.S. and Rau, J.V. (2020) Biocompatibility of biphasic  $\alpha$ ,  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics in vitro. *Bioactive Materials*, 5, 423-427. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.03.007>
- [15] Domingues, J.A., Motisuke, M., Bertran, C.A., Hausen, M.A., Duek, E.A.R. and Camilli, J.A. (2017) Addition of Wollastonite Fibers to Calcium Phosphate Cement Increases Cell Viability and Stimulates Differentiation of Osteoblast-Like Cells. *The Scientific World Journal*, 2017, 5260106. <https://doi.org/10.1155/2017/5260106>
- [16] De Souza, A.C., McNulty, C. Camilli, J., Bertran, C.A. and Motisuke, M. (2020) Calcium Phosphate Cement Plus 10% Wollastonite Whiskers: An In Vivo Study. *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering*, 47, 117-126. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JBBBE.47.117>
- [17] Fortaleza, L.M. de M., Alves, A.M.M., Maia Filho, A.L.M., Ferreira, D.C.L., Costa, C.L.S., Viana, V.G.F., Santos, J.Z.L.V., Oliveira, R.A, Viana, B.C., Gusmão, G.O.M., Soares, L.E.S. (2020) Raman spectroscopy analysis of bone regeneration in a rat model by implantation of a biocompatible membrane scaffold with and without LED photobiomodulation ( $\lambda$  945  $\pm$  20 nm). *Vibrational Spectroscopy*, 111, 103154. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103154>
- [18] Timchenko, E.V., Timchenko, P.E., Pisareva, E.V., Vlasov, M. Yu., Volova, L.T., Fedorov, A.A., Fedorova, Ya. V., Tyumchenkova, A.S., Romanova, D.A., Daniel, M.A. and Subatovic, A.N. (2020). Optical analysis of bone tissue by Raman spectroscopy in experimental osteoporosis and its correction using allogeneic hydroxyapatite. *Journal of Optical Technology*, 87, 161-167. <https://doi.org/10.1364/JOT.87.000161>
- [19] Mazón, P., Ros-Tárraga, P., Serena, S., Meseguer-Olmo, L., De Aza, PN (2019) In Vitro Bioactivity and Cell Biocompatibility of a Hypereutectic Bioceramic. *Symmetry*, 11(3), 355. <https://doi.org/10.3390/sym11030355>
- [20] Borkowski, L., Sroka-Bartnicka, A., Polkowska, I., Pawlowska, M., Palka, K., Zieba, E., Slosarczyk, A., Jozwiak, K. and Ginalska, G. (2017) New approach in evaluation of ceramic-



- polymer composite bioactivity and biocompatibility. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 5747–5755. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0518-0>
- [21] Ember, K.J.I., Hoeve, M.A., McAughtrie, S.L., Bergholt, M.S., Dwyer, B.J., Stevens, M.M., Faulds, K., Forbes, S.J. and Campbell, C.J. (2017) Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *npj Regen Med*, 2, 12. <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0014-3>
- [22] Das, R. and Agrawal, Y. (2011). Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy*, 57(2), 163-176. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.08.003>
- [23] Butler, H.J., Ashton, L., Bird, B., Cinque, G., Curtis, K., Dorney, J., et al. (2016) Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols*, 11, 664-687. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.036>.
- [24] National Research Council (2011) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th Edition, The National Academies Press, Washington D.C. <https://doi.org/10.17226/12910>
- [25] Meade, A., Clarke, C., Draux, F., Sockalingum, G., Manfait, M., Lyng, F., Byrne, H.J. (2010) Studies of chemical fixation effects in human cell lines using Raman microspectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(5), 1781-1791. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3411-7>
- [26] Huang, E., Chen, C.H., Huang, T., Lin, E.H., Xu, J.-A. (2000) Raman spectroscopic characteristics of Mg-Fe-Ca pyroxenes. *American Mineralogist*, 85, 473–479. <https://doi.org/10.2138/am-2000-0408>
- [27] Swamy, V., Dubrovinsky, L.S., Tutti, F. (2010) High-Temperature Raman Spectra and Thermal Expansion of Wollastonite. *Journal of the American Ceramic Society*, 8, 2237-2247. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1997.tb03113.x>
- [28] Richet, P., Mysen, B.O., Ingrin, J. (1998) High-temperature X-ray diffraction and Raman spectroscopy of diopside and pseudowollastonite. *Physics and Chemistry of Minerals*, 25, 401-414. <https://doi.org/10.1007/s002690050130>
- [29] Jilavenkatesa, A., Condrate, R.A. (1998) The Infrared and Raman Spectra of  $\beta$ - and  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). *Spectroscopy Letters*, 31, 1619 — 1634. <https://doi.org/10.1080/00387019808007439>
- [30] De Aza, P.N., Santos, C., Pazo, A., De Aza, S., Cuscó, R., Artús, L. (1997) Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 1. Raman Spectrum of  $\beta$ -Tricalcium Phosphate. *Chemistry of Materials*, 9, 912-915. <https://doi.org/10.1021/CM960425D>
- [31] De Aza, P.N., Santos, C., Pazo, A., De Aza, S., Cuscó, R., Artús, L. (1997) Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 2. Comparison between Hydroxyapatite and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate. *Chemistry of Materials*, 9, 916-922. <https://doi.org/10.1021/CM9604266>

- [32] Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2007). Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42, 493-541. <http://dx.doi.org/10.1080/05704920701551530>
- [33] Janicki, P., Schmidmaier, G. (2011) What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*, 42, 77-81. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.014>
- [34] Adams, L.A., Essien, E.R., Kaufmann, E.E. (2019) Mechanical and bioactivity assessment of wollastonite/PVA composite synthesized from bentonite clay. *Cerâmica*, 65, 246-251. <https://doi.org/10.1590/0366-69132019653742584>
- [35] Sharma, S., Patil, D.J., Soni, V.P., Sarkate, L.B., Khandekar, G.S., Bellare, J.R. (2009) Bone healing performance of electrophoretically deposited apatite-wollastonite/chitosan coating on titanium implants in rabbit tibiae. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 3, 501-511. <https://doi.org/10.1002/term.186>
- [36] Xu, S., Lin, K., Wang, Z., Chang, J., Wang, L., Lu, J., Ning, C. (2008) Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials*, 29, 2588-2596. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.013>
- [37] Sun, M., Liu, A., Shao, H., Yang, X., Ma, C., Yan, S., Liu, Y., He, Y., Gou, Z. (2016) Systematical Evaluation of Mechanically Strong 3D Printed Diluted magnesium Doping Wollastonite Scaffolds on Osteogenic Capacity in Rabbit Calvarial Defects. *Scientific Reports*, 6, 34029. <https://doi.org/10.1038/srep34029>
- [38] Guo, H., Wei, J., Song, W., Zhang, S., Yan, Y., Liu, C., Xiao, T. (2012) Wollastonite nanofiber-doped self-setting calcium phosphate bioactive cement for bone tissue regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3613-3624. <https://doi.org/10.2147/IJN.S32061>
- [39] Paluszkiwicz, C., Błażewicz, M., Podporska, J., Gumuła, T. (2020) Nucleation of hydroxyapatite layer on wollastonite material surface: FTIR studies. *Vibrational Spectroscopy*, 48, 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2008.02.2020>
- [40] Meseguer-Olmo, L., Aznar-Cervantes, S., Mazón, P., De Aza, P.N. (2012) "In vitro" behaviour of adult mesenchymal stem cells of human bone marrow origin seeded on a novel bioactive ceramics in the  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  system. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 3003-3014. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4742-z>.
- [41] Chang, N.J., Chen, Y.W., Shieh, D.E., Fang, H.Y., Shie, M.Y. (2015) The effects of injectable calcium silicate-based composites with the Chinese herb on an osteogenic accelerator in vitro. *Biomedical Materials*, 10, 055004. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/5/055004>
- [42] Filho, A.L.M.M., Amaral, F.P.M., Martin, A.A., Soares, L.E.S. (2014). Evaluation of inorganic and organic bone components after application of an apatite-coated  $\text{Al}_2\text{O}_3$  implants as scaffolds for bone repair. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57,

334-339. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014005000002>

- [43] Omar, O., Engstrand, T., Kihlström B., Linder, L., Åberg, J., Shah, F.A., et al. (2020) In situ bone regeneration of large cranial defects using synthetic ceramic implants with a tailored composition and design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117, 26660-26671. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007635117>
- [44] Pinheiro, A.L.B., Soares, L.G.P., Marques, A.M.C., Cangussú, M.C.T., Pacheco, M.T.T., Silveira, L.Jr. (2017) Biochemical changes on the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic micro-granular HA +  $\beta$ -tricalcium phosphate induced by laser and LED phototherapies and assessed by Raman spectroscopy. *Lasers in Medical Science*, 32, 663-672. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2165-2>
- [45] Ozaki, H., Hamai, R., Shiwaku, Y., Sakai, S., Tsuchiya, K., Suzuki, O. (2021) Mutual chemical effect of autograft and octacalcium phosphate implantation on enhancing intramembranous bone regeneration. *Science and Technology of Advanced Materials*, 22, 345-362. <https://doi.org/10.1080/146896.2021.1978>
- [46] Uribe, P., Johansson, A., Jugdaohsingh, R., Powell, J.J., Magnusson, C., Davila, M., et al. (2007) Soluble silica stimulates osteogenic differentiation and gap junction communication in human dental follicle cells. *Scientific Reports*, 10, 9923. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66939-1>
- [47] dos Santos, G.G., Borges Miguel, I.R.J., Barbosa Junior, A.A., Barbosa, W.T., K de Almeida, K.V., García-Carrodeguas, R., Fook, M.V.L., Rodríguez, M.A., Borges Miguel, F., de Araújo, R.P.C., Rosa, F.P. (2021) Bone regeneration using Wollastonite/ $\beta$ -TCP scaffolds implants in critical bone defect in rat calvaria. *Biomedical Physicas & Engineering Express*, 7, Article ID: 055015. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/ac1878>
- [48] Li, Y., Weng, W., Tam, K.C. (2007) Novel highly biodegradable biphasic tricalcium phosphates composed of alpha-tricalcium phosphate and beta-tricalcium phosphate. *Acta Biomaterialia*, 3, 251-254. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.07.003>.
- [49] Xie, L., Yu, H., Deng, Y., Yang, W., Liao, L., Long, Q. (2016) Preparation, characterization and in vitro dissolution behavior of porous biphasic  $\alpha/\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 1007-1015. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.040>
- [50] De Aza, P.N., Peña, J.I., Luklinska, Z.B., Meseguer-Olmo, L. (2014) Bioeutectic® Ceramics for Biomedical Application Obtained by Laser Floating Zone Method. In vivo Evaluation. *Materials*, 7, 2395-2410. <https://doi.org/10.3390/ma7042395>.
- [51] Pelletier, M.J. (2003) Quantitative analysis using Raman spectrometry. *Applied Spectroscopy*, 57, 20A-42A. <https://doi.org/10.1366/000370203321165133>.
- [52] Karan, K., Yao, X., Xu, C., Wang, Y. (2009) Chemical profile of the dentin substrate in non-carious cervical lesions. *Dental Materials*, 25, 1205-1212. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.04.006>

### 7.3 ARTIGO 3: Compositional analysis and structural phases of glass-ceramics developed with different Wollastonite and TCP proportions using Raman spectroscopy

Mauricio Mitsuo Monção<sup>1,2\*</sup>, Isabela Cerqueira Barreto<sup>2</sup>, Luiz Fernando Cappa de Oliveira<sup>3</sup>, Roberto Paulo Correia de Araújo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Technology in Health and Biology, IFBA, Salvador, BA, Brazil.

<sup>2</sup>Tissue Bioengineering Laboratory and Biomaterials, UFBA, Salvador, BA, Brazil.

<sup>3</sup>Nucleus for Spectroscopy and Molecular Structure, UFJF, Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil.

<sup>4</sup>Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil.

\*maurimitsuo@yahoo.com.br

<https://orcid.org/0000-0003-0183-1992>

**Abstract:** The development of glass-ceramics based on wollastonite (W) and tricalcium phosphate (W) is a strategy to obtain bone substitute with better performance in the treatment of bone defects. The present study analyzed the vibrational and structural properties of glass-ceramics obtained with sintering and crystallization of different W and TCP powder proportions. Powder mixtures were prepared and sintered at 1250°C and processed to obtain granules with sizes of 400 ~ 600 µm. Samples were named W20/TCP80, W60/TCP40 and W80/TCP20, according to their different W and TCP proportions, and analyzed in an FT-Raman system, with laser excitation at 1064 nm. Spectra at different points showed well-defined bands in the region between 300 and 700 cm<sup>-1</sup> and 900 and 1100 cm<sup>-1</sup>, characteristic of vibrational modes of SiO<sub>4</sub> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> groups. The unambiguous spectra allowed the identification of the main vibrational modes and confirmed different predominance of α-W, β-TCP α-TCP polymorphs. The different Raman vibrational profiles indicate the possibility of glass-ceramics presenting different dissolution, biodegradation and bioresorption behaviors during the treatment of bone defects.

**Keywords:** Wollastonite; Tricalcium Phosphate; Glass-ceramics; Raman Spectroscopy.

**Resumo:** O desenvolvimento de vitrocerâmicas à base de wollastonita (W) e fosfato tricálcico (W) é uma estratégia para obter substituto ósseo com melhor desempenho no tratamento de defeitos ósseos. O presente estudo analisou as propriedades vibracionais e estruturais de vitrocerâmicas obtidas com sinterização e cristalização de diferentes proporções de pós W e TCP. As misturas de pós foram preparadas e sinterizadas a 1250 °C e processadas para obter grânulos com tamanhos entre 400 ~ 600 µm. As amostras foram denominadas W20/TCP80, W60/TCP40 e W80/TCP20, de acordo com suas diferentes proporções de W e TCP, e analisadas em sistema FT-Raman, com excitação do laser em 1064 nm. Os espectros em diferentes pontos biológicos apresentaram bandas bem definidas na região entre 300 e 700 cm<sup>-1</sup> e 900 e 1100 cm<sup>-1</sup>, características dos modos vibracionais dos grupos SiO<sub>4</sub> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Os espectros sem ambiguidades permitiram a identificação dos principais modos vibracionais e confirmaram diferentes predominâncias dos polimorfos α-W, β-TCP α-TCP. Os diferentes perfis vibracionais Raman indicam a possibilidade das vitrocerâmicas apresentarem diferentes comportamentos de dissolução, biodegradação e biorreabsorção durante o tratamento de defeitos ósseos.

**Palavras chaves:** Wollastonita. Fosfato tricálcico. Vitrocerâmica. Espectroscopia Raman.

## INTRODUCTION

Biomedical alternatives with greater potential for bone regeneration stimulates research that combines different materials to obtain better physicochemical performance. It is known that the spontaneous bone repair mechanism does not promote structural and functional regeneration in situations of large bone losses [1]. Therefore, is necessary to develop biomaterials capable of providing biochemical stimuli during the complex process of bone regeneration, instead of just tissue replacement [2]. Glass-ceramic systems based on wollastonite (W) and tricalcium phosphate (TCP) have attracted interest due to their potential for osteogenesis and osteoconduction [3-8].

The great mechanical strength and bioactivity related to silicon and calcium release, places W among the most widely researched materials for the development of biomaterials for bone regeneration purposes [9,10]. W is considered an important reinforcer with high efficiency reported in bone regeneration research using biomaterials [11]. When in contact with fluids and biological components, W has great reactivity with higher dissolution rate compared to other types of bioceramics, promoting superior bioactivity, compared to calcium phosphate-based materials [12].

Calcium phosphates are minerals that are similar to the mineral phase of bone components, teeth, and calcified tissues [13]. The properties of different calcium phosphates allow extensive use for clinical applications, as well as application in the development of new composite biomaterials with bone regeneration characteristics [14,15]. TCP is one of the most widely used materials as bone substitutes among calcium phosphates due to its biodegradability, good bioresorption rates, osteoconductivity and bone adhesion. However, it has the disadvantage of low mechanical strength, thus obtaining glass-ceramic based on W and TCP allows obtaining a combination of different physicochemical properties that favor bone regeneration.

Furthermore, using different weight percentages of glass-ceramic competent minerals can be a strategy to adjust the dissolution rate, biodegradation, release of bioactive ions and maintenance of support for cell migration [4,8]. Adjusting the amount of each mineral becomes a challenge in the search for the best proportion to obtain greater interactions between the glass-ceramic and the biological system. Among the various analytical techniques used in research with glass-ceramics, Raman spectroscopy has been widely used in the *in vivo* characterization and evaluation of biological responses throughout bone regeneration [16-19]. It is a non-destructive technique that requires little or no special preparation widely used in the structural and

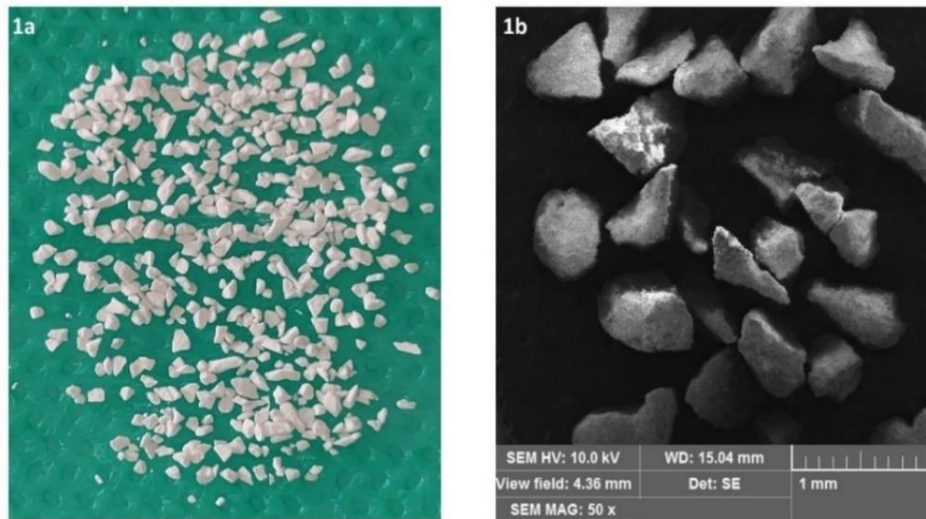
molecular analysis of complex compounds. This technique relies fundamentally on the Raman effect which measures the inelastic scattering of a monochromatic radiation incident on a sample, the interpretation of which provides information about its chemical composition and crystal structure [20]. Raman spectroscopy is a technique that uses the interaction of light with matter to identify the chemical composition and crystal structure of a sample [21]. Raman spectroscopy is considered a powerful tool in the characterization of crystalline and non-crystalline materials such as glass and ceramics [22].

The present study aimed to analyze the vibrational and structural properties of experimental glass-ceramics developed with different W20/TCP80, W60/TCP40 and W80/TCP20 weight percentages, in the granular form, with the purpose of bone regeneration. Thus, the identification of the polymorphic predominance can predict the dissolution, biodegradation and bioresorption behavior of glass-ceramics when applied in an *in vivo* experimental study.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Glass-ceramics**

Glass-ceramics were developed with the combination of minerals natural wollastonite ( $\text{CaSiO}_3$ , NYCO, NYAD M1250) and tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ , Sigma-Aldrich), with three different W and TCP weight percentages. Each proportion was separately moistened in isopropanol, homogenized in a ball mill (zirconia 3.0 mm diameter) for 15 minutes, forming a paste. Samples were then dried at 60 °C for 12 hours and sintered at 1250 °C according to the eutectic point of the W-TCP binary system, which corresponds to 60% of W and 40% of TCP [23]. The other glass-ceramics were formulated considering the extremes of the W and TCP weight percentage proportion, being W20/TCP80 and W80/TCP20. The sintering times used were: W20/TCP80 = 5 minutes (hypereutectic); W60/TCP40 = 60 minutes (eutectic); and W80/TCP20 = 180 minutes (hypoeutectic). Subsequently, samples were processed in a jaw crusher and granules with sizes between 400 and 600  $\mu\text{m}$  were selected through sieving. Samples of each glass-ceramics named W20/TCP80, W60/TCP40 and W80/TCP20 weighing 5.0 g each were selected and placed in refractory glass flasks and dry sterilized for 2 hours at temperature of 160 °C. Figure 1 represents the aspects of glass-ceramics.



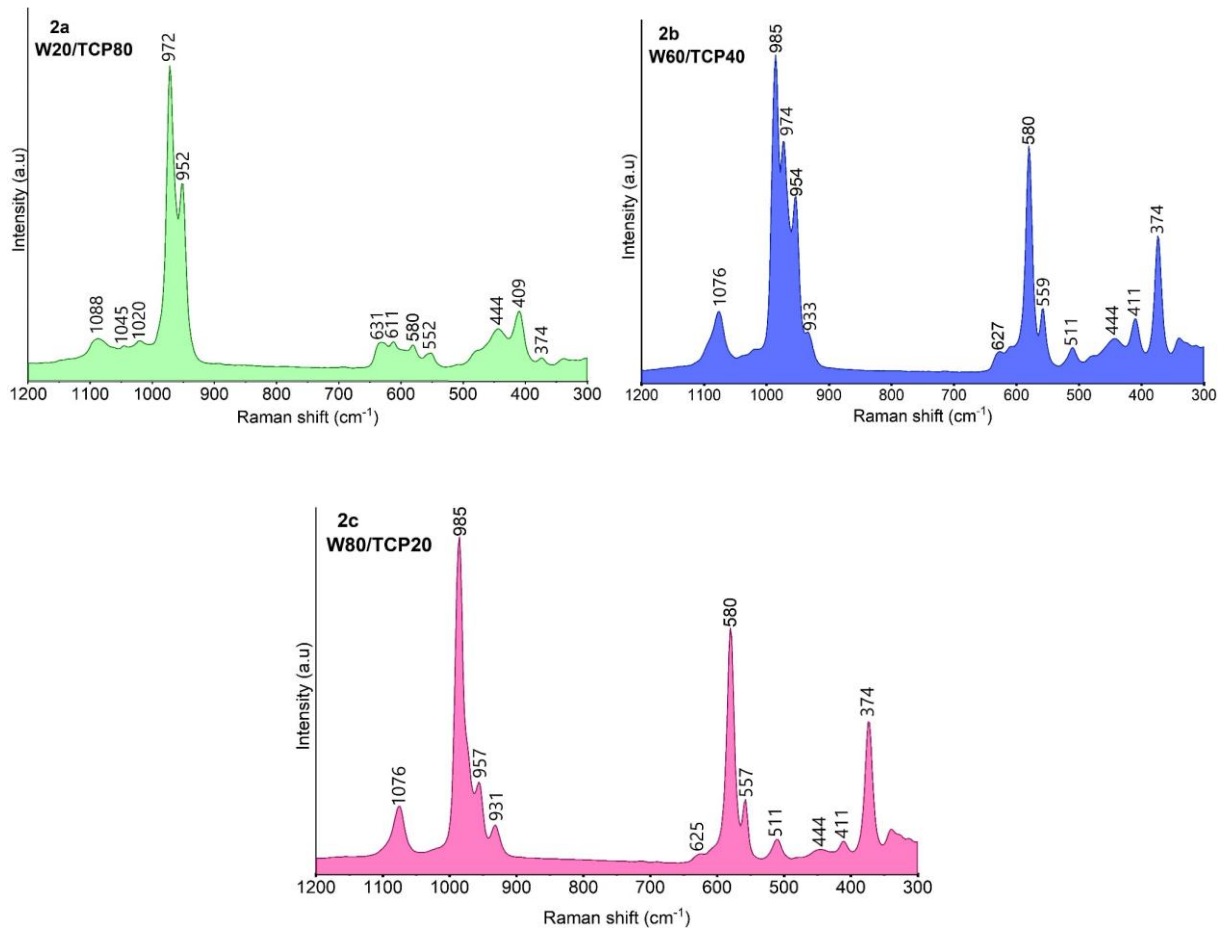
**Figure 1:** W and TCP-based glass-ceramics. (1a) Glass-ceramics present similar characteristics for dimensions, shape, and color. (1b) Scanning electron microscopy image details irregular and multifaceted granules.

## 2.2. Raman spectroscopy and analysis of results

A Fourier transform Raman spectroscopy system (FT-Raman), brand Bruker, model RFS 100, with laser excitation operating at 1064 nm in the near infrared, was used. The Raman signals were collected by a liquid nitrogen cooled germanium detector. No special preparation of the samples was required, and they were simply placed in the system's own aluminum sample holder. Measurements were obtained with resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  and scans of 512 accumulations in the region between  $300$  and  $1200\text{ cm}^{-1}$ . These parameters were previously adjusted to obtain the best possible signal-to-noise resolution without altering the physical and chemical integrity of samples. The OPUS 6.0 software (Bruker Optik, Ettlingen, Germany) was used to acquire Raman data, and all spectra were obtained at least three times, at different points in the sample, to verify the reproducibility of the system and possible uncertainties about the intensity or displacement of vibrational bands observed in the spectra. The GRAMS/AI 7.02 software package (Thermo Galactic, USA) was used to import/export the Bruker OPUS File Format data and conversion to ASCII-XY. The spectra were plotted in the OriginLab® version 2020b software and analyzed for the presence, position, width, and intensities of Raman bands, which were interpreted according to literature for the assignment of vibrational modes.

## RESULTS

W20/TCP80, W60/TCP40 and W80/TCP20 samples exhibited well defined Raman bands in regions between 1100 and 900  $\text{cm}^{-1}$  and 700 and 300  $\text{cm}^{-1}$ . W20/TCP80 sample exhibited predominant bands assigned to the  $\beta$ -TCP mineral phase (1088, 1045, 1020, 972, 631, 552, 444, and 409  $\text{cm}^{-1}$ ), 952  $\text{cm}^{-1}$  band assigned to the  $\alpha$ -TCP, and the bands 580 and 374  $\text{cm}^{-1}$  assigned to the  $\alpha$ -W mineral phase. In contrast, W60/TCP40 and W80/TCP20 samples showed predominance of bands assigned to  $\alpha$ -W (1076, 985, 933, 931, 580, 559, 557, 511 and 374  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -TCP (974, 627, 625, 444 and 411  $\text{cm}^{-1}$ ), and  $\alpha$ -TCP (954 and 957  $\text{cm}^{-1}$ , respectively) mineral phases. Figure 2 presents individual representative spectra obtained from samples. The Raman bands observed in the representative spectra were discussed with the literature, and the assignments of the vibrational modes presented in Table 01.



**Figure 2:** Representative Raman spectra obtained from samples under study. (2a) W20/TCP80 demonstrates predominance of Raman bands characteristic of the  $\beta$ -TCP polymorph. (2b and 2c) W60/TCP40 and W80/TCP20 exhibit similar Raman bands characteristic of  $\alpha$ -W,  $\beta$ -TCP and  $\alpha$ -TCP phases. The different W and TCP weight percentages resulted in different intensity for the 957  $\text{cm}^{-1}$  band ( $\alpha$ -TCP), and absence of the 974  $\text{cm}^{-1}$  band ( $\beta$ -TCP) in W80/TCP20.



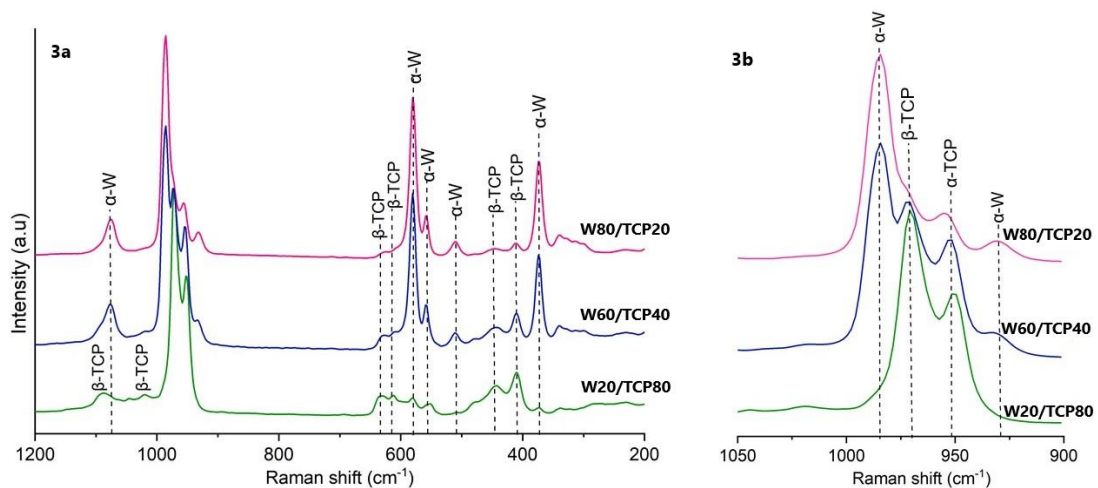
**Table 1:** Main Raman bands identified in the glass-ceramics, characteristics of intensities and vibrational mode assignments.

Bands (cm <sup>-1</sup> )	W20/TCP80	W60/TCP40	W80/TCP20	Vibrational mode assignment
374	vw	M	M	Si-O bending mode in SiO <sub>4</sub> (v2)
411	w	w	vw	O-P-O bending mode in PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (v2)
444	w	w	vw	O-P-O bending mode PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (v2)
511	---	w	w	Si-O-Si bending mode in SiO <sub>4</sub> (v4)
552	w	---	---	P-O-P bending mode in PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (v4)
557-559	---	sh	sh	Si-O-Si bending mode in SiO <sub>4</sub> (v4)
580	M	S	S	Si-O-Si bending mode in SiO <sub>4</sub> (v4)
611	vw	---	---	P-O-P bending mode in PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (v4)
627-631	w	w	w	P-O-P bending mode in PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (v4)
931-933	---	sh	sh	Si-O symmetric stretching in SiO <sub>4</sub> (v1)
952	S	---	---	P-OH symmetric stretching in PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (v1)
954-957	---	S	M	P-O symmetric stretching in PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (v1)
972-974	vS	S	---	P-O symmetric stretching in PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (v1)
985	---	vS	vS	Si-O symmetric stretching in SiO <sub>4</sub> (v1)
1045	w	---	---	P-O symmetric stretching in PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (v3)
1076	---	w	w	Si-O antisymmetric stretching in SiO <sub>4</sub> (v3)
1088	w	---	---	O-P-O antisymmetric stretching in PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (v3)

Legend: To indicate the relative intensities, the following notation was used: S = strong; vS = very strong; M = medium; w = weak; vw = very weak; sh = shoulder; --- = No corresponding band number identified.

Source: Prepared by the authors, 2021.

W60/TCP40 sample exhibited a complex band whose base extends between 900 and 1000 cm<sup>-1</sup> and split at 933, 954, 974, and 985 cm<sup>-1</sup>. In the same region, W80/TCP20 sample shows 931, 957 and 985 cm<sup>-1</sup> bands. W20/TCP80 sample shows only one band divided at 952 and 972 cm<sup>-1</sup>. Figure 3 shows the comparison between the representative spectra obtained from glass-ceramic samples and the respective differences in intensity of bands attributed to the different polymorphs.



**Figure 3:** (3a) Representative Raman spectra of glass-ceramic and indication of polymorphs associated with the main Raman bands. (3b) Magnification of the region between 900 and 1050 cm<sup>-1</sup> details aspects of the complex Raman band formed by the superposition of  $\alpha$ -W,  $\beta$  and  $\alpha$ -TCP mineral phases.

## DISCUSSION

FT-Raman spectroscopy allowed spectra to be obtained with well-defined bands allowing identification in regions between 300 and 700  $\text{cm}^{-1}$  and 900 and 1200  $\text{cm}^{-1}$  and the major vibration modes characteristic of glass-ceramic mineral polymorphs. Mazón and coauthors [24] evaluated the properties of biphasic ceramic developed with 30% W and 70% TCP and reported similar Raman bands in the same region, which were attributed to the presence of biphasic ceramic polymorphs. Furthermore, due to the high spectral resolution, previous studies have shown the ability of Raman spectroscopy to demonstrate mineral polymorphs in multiphase ceramics, due to the ability to identify and distinguish vibrational modes in different crystal lattices [5,22,25].

In this study with glass-ceramics sintered at 1250 °C, Raman spectroscopy identified 511, 557, 559, 580, 933, 985 and 1076  $\text{cm}^{-1}$  bands attributed to vibration modes of the  $\text{SiO}_4$  group, characteristic of the pseudowollastonite phase ( $\alpha$ -W), and 411, 444, 552, 631, 627, 611, 972, 1020 and 1088  $\text{cm}^{-1}$  bands to internal vibration modes of the  $\text{PO}_4^{3-}$  group characteristic of the  $\beta$ -TCP polymorph. All these bands agree with results reported in studies with W and TCP sintered at temperatures similar to those used in this study, which were analyzed with Raman spectroscopy [18,25-27]. The 952, 954 and 957  $\text{cm}^{-1}$  bands identified in W20/TCP80, W60/TCP40 and W80/TCP20, respectively, was associated with the formation of silicon-stabilized  $\alpha$ -TCP [28,29].

Abd El Rahim, Melegy and Hamzawy [30] identified the formation of the  $\alpha$ -W polymorph in ceramic samples submitted to temperatures between 1150 °C and 1250 °C. Li and coauthors [31] reported the formation of the  $\alpha$ -W crystalline phase at temperatures close to 1200 °C. Studies reporting  $\alpha$ -W formation at low temperature were not found in literature. Thus, it is understood that the temperature of 1250 °C used in the sintering process of samples promoted the crystalline phase transition, resulting in the predominance of Raman bands characteristic of the  $\alpha$ -W polymorph, which is desirable for glass-ceramics under study [18,32,33].

Previous studies with tricalcium phosphate-based bioceramics have reported obtaining the  $\beta$ -TCP polymorph at temperatures between 900 and 1100 °C [15,34]. It is known that other TCP polymorphs occur at higher temperatures, according to Carrodegua and De Aza [35], who analyzed the phase stability of calcium phosphates and verified the crystalline phase transition from  $\beta$ -TCP to  $\alpha$ -TCP from 1125 °C, and from  $\alpha$ -TCP to  $\alpha'$ -TCP from 1470 °C. However, it should be considered that there is no exact temperature for obtaining each TCP polymorph and

the technique used to obtain TCP and the association with other materials can cause temperature variations necessary for the transition of crystalline phases [36].

Raman bands characteristic of natural wollastonite (338, 412, 502, 581, 635, 887, 968, 1042, 1097 and 1113  $\text{cm}^{-1}$ ) or of amorphous calcium phosphate (419, 451, 594, 951, 1050 and 1118  $\text{cm}^{-1}$ ) were not observed [37,38]. Thus, the spectra obtained from samples indicate that the sintering temperature promoted the transition of crystalline phases, resulting in the predominance of  $\alpha$ -W and  $\beta$ -TCP polymorphs. According to Ohlin and coauthors [39], natural wollastonite has slower dissolution compared to the  $\alpha$ -W polymorph, and according to Zhao and coauthors [40], amorphous calcium phosphate is highly unstable in aqueous media. Therefore, the predominance of  $\alpha$ -W and  $\beta$ -TCP polymorphs is desirable for the glass-ceramics under study as such polymorphs have better performance during bone regeneration when compared to precursor forms used in the manufacture of glass-ceramics [15,41,42].

For W60/TCP40 and W80/TCP20 samples, the formation of a complex band was identified, whose base extends between 900 and 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Similar result was described by Lopes and coauthors [26], who investigated the properties of a  $\beta$ -TCP-based composite with the addition of 5 and 7.5% of Biovidro® 45S5 by mass, sintered at 1200 °C. The authors verified the formation of a complex band between 930 and 980  $\text{cm}^{-1}$ , divided into 951, 955 and 972  $\text{cm}^{-1}$ , and associated the spectral shift at high frequencies with the formation of the  $\alpha$ -TCP phase stabilized with silicon. This result was attributed to the silicon incorporation model in the TCP structure, which acts as a crystalline phase catalyst [29,43]. This study also highlighted that it was not possible to verify characteristic Raman bands of bioglass and concluded that the result obtained was due to the incorporation of silicon into the crystal structure of TCP under high-temperature conditions.

In this study, the complex bandwidth between 900 and 1000  $\text{cm}^{-1}$  indicated the overlapping of several Raman bands; however, without ambiguity for 931, 933 and 985  $\text{cm}^{-1}$  bands characteristic of  $\alpha$ -W, 972 and 974  $\text{cm}^{-1}$  bands assigned to  $\beta$ -TCP, the 952, 954 and 957  $\text{cm}^{-1}$  bands assigned to  $\alpha$ -TCP phase. Considering that the samples under study were sintered at 1250 °C, the presence of the 952, 954 and 957  $\text{cm}^{-1}$  bands confirm spectral changes at high frequencies, according to studies on composites that associated silicates and TCP [26,43]. It is known that silicon can replace phosphorus in the TCP network resulting in the Si-TCP phase, or, promoting the transition to the  $\alpha$ -TCP phase stabilized with silicon at temperatures lower than the conventional phase diagram [22,29,44]. It is noteworthy that the Si-TCP and  $\alpha$ -TCP

phases present crystalline system symmetry, which makes it difficult to differentiate between these phases through Raman spectroscopy due to overlapping bands [45].

W60/TCP40 and W80/TCP20 samples demonstrated spectral similarity for Raman bands attributed to the  $\alpha$ -W polymorph in all analyzed regions. In the study by Krz̄ała and coauthors [46], the characteristic  $\alpha$ -W bands associated with the vibration modes of  $\text{SiO}_4$  tetrahedrons are reported, similar to those identified in our study. At high frequencies, the band  $1076\text{ cm}^{-1}$  was attributed to the Si-O asymmetric stretching mode ( $\nu_3$ ), and the bands  $933$  and  $985\text{ cm}^{-1}$  were attributed to the Si-O symmetric stretching mode ( $\nu_1$ ). At medium frequencies,  $511$ ,  $557$ ,  $559$  and  $580\text{ cm}^{-1}$  bands were shown, assigned to bending modes in  $\text{SiO}_4$  ( $\nu_4$ ). At low frequencies, the  $374\text{ cm}^{-1}$  band was attributed to the symmetric stretch of Si-O ( $\nu_2$ ). For W20/TCP80, only bands ( $\nu_2$ )  $374\text{ cm}^{-1}$  and ( $\nu_4$ ) at  $580\text{ cm}^{-1}$  were observed with very weak intensities, with the absence of the other bands, indicative of the low  $\alpha$ -W mass percentage proportion in the sample [18,32,33,37,48].

Regarding the internal vibrations of tetrahedrons of the  $\text{PO}_4^{3-}$  group, for the W20/TCP80 sample, the highest TCP mass ratio determined spectra with predominance of bands attributed to the phosphate group in all analyzed regions. This showed emphasis on  $952$  and  $972\text{ cm}^{-1}$  bands with very strong and strong intensities, which can be attributed to the symmetric stretching mode of  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\nu_1$ ), confirming the presence of the  $\beta$ -TCP and  $\alpha$ -TCP phases [47,48]. W60/TCP40 and W80/TCP20 samples showed spectral similarity for bands attributed to internal vibrations of the  $\text{PO}_4^{3-}$  group in the region between  $300$  and  $650\text{ cm}^{-1}$ , with  $441$  and  $444\text{ cm}^{-1}$  bands, with weak intensities attributed to the doubly degenerate bend O-P-O ( $\nu_2$ ),  $627$  and  $631\text{ cm}^{-1}$  bands attributed to triple degenerate bend O-P-O ( $\nu_4$ ). The complex band displayed in the region between  $900$  and  $1000\text{ cm}^{-1}$  showed in the W60/TCP40 sample,  $974\text{ cm}^{-1}$  bands with strong intensity and  $954\text{ cm}^{-1}$  with medium intensity, while in W80/TCP20, only band  $957\text{ cm}^{-1}$  was observed with very weak intensity, attributed to the P-O symmetric stretching ( $\nu_1$ ). These results are in line with previous studies that analyzed bioceramics manufactured with tricalcium phosphates [49,50].

Comparing the spectra obtained in samples under study, it is possible to state that  $374$  and  $580\text{ cm}^{-1}$  bands observed with very weak intensities at W20/TCP80 corresponded to the lowest  $\alpha$ -W phase mass proportion. Likewise, at W80/TCP20, absence of the  $974\text{ cm}^{-1}$  band and weak intensity of  $957\text{ cm}^{-1}$  band that corresponded to smaller TCP phase mass proportion. These results confirm the biphasic hierarchical structure, where differences between relative

intensities, or non-visualization of some characteristic Raman bands, indicate spectral overlap in the analyzed regions and correspond to the mass predominance of one polymorph over the other.

In this study, positions and relative intensity of bands resulted in the Raman vibrational profile of each sample. According to Tuschel [51], the reference Raman spectra of polymorphs from a multiphase system can be reliably used to confirm crystalline forms. Comparing with Raman spectra reported in literature and in databases, it could be verified that the vibrational profiles of glass-ceramics under study present overlapping characteristic bands of silicon-stabilized  $\alpha$ -W,  $\beta$ -TCP and  $\alpha$ -TCP polymorphs, with predominance of phases according to the different W and TCP weight percentages used in the manufacture.

Although polymorphs of a mineral are chemically identical, it is known that different crystal forms have different *in vivo* behaviors [52]. Therefore, the predominance of  $\alpha$ -W,  $\beta$ -TCP and  $\alpha$ -TCP polymorphic types demonstrated in vibrational profiles provide greater prediction of the behavior of glass-ceramics for *in vivo* evaluations.

## CONCLUSION

It could be concluded that the FT-Raman system provided spectra with high quality and without ambiguities, which allowed the identification of most vibrational modes, and confirming the predominance of  $\alpha$ -W,  $\beta$ -TCP and  $\alpha$ -TCP polymorphs in glass-ceramics. This different predominance of polymorphs indicates the possibility of obtaining different behaviors for dissolution, biodegradation and bioresorption during *in vivo* bone repair.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgments

The authors would like special thanks to Professor Fabiana Pain Rosa, to Foundation for Research Support of the State of Bahia – FAPESB for the financial support, to Department of Health Technology and to the Material Characterization Laboratory and the Federal Institute of Education, Science and Technology of Bahia. Special thanks to Mr. Raul Garcia Carrodeguas researcher at Noricum S.L., creator of the glass-ceramics under study.

## REFERENCES

1. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-555. DOI: 10.1016/j.injury.2011.03.031
2. Sergi R, Bellucci D, Cannillo V. A Review of Bioactive Glass/Natural Polymer Composites: State of the Art. *Materials*. 2020;13(23):5560. DOI:10.3390/ma13235560
3. Carrodegua RG, De Aza AH, De Aza PN, Baudín C, Jiménez J, López-Bravo A, Pena P, De Aza S. Assessment of natural and synthetic wollastonite as source for bioceramics preparation. *J Biomed Mater Res A*. 2007;83(2):484-95. DOI:10.1002/jbm.a.31216.
4. Domingues JA, Motisuke M, Bertran CA, Hausen MA, Duek EAR, Camilli JA. Addition of Wollastonite Fibers to Calcium Phosphate Cement Increases Cell Viability and Stimulates Differentiation of Osteoblast-Like Cells. *Scientific World Journal*. 2017;2017:5260106. DOI: 10.1155/2017/5260106
5. Sola D, Grima L. Laser Machining and In Vitro Assessment of Wollastonite-Tricalcium Phosphate Eutectic Glasses and Glass-Ceramics. *Materials (Basel)*. 2018;11(1):125. DOI: 10.3390/ma11010125
6. Ros-Tárraga P, Mazón P, Revilla-Nuin B, Rabadán-Ros R, de Aza PN, Meseguer-Olmo L. High temperature  $\text{CaSiO}_3\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ceramic promotes osteogenic differentiation in adult human mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;107:110355. DOI:10.1016/j.msec.2019.110355.
7. Barbosa WT, de Almeida KV, de Lima GG, Rodriguez MA, Lia Fook MV, García-Carrodegua R, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ $\beta$ -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(3):1107-1116. DOI:10.1002/jbm.b.34462.
8. Souza AC, McNulty C, Camilli JA, Bertran CA, Motisuke M. Calcium Phosphate Cement Plus 10% Wollastonite Whiskers: An In Vivo Study. *J Biomim Biomater Biomed Eng*. 2020;47:117-126. DOI:10.4028/www.scientific.net/JBBBE.47.117
9. Bains F, Verne E. Production and characterization of glass-ceramic materials for potential use in dental applications: thermal and mechanical properties, microstructure, and in vitro bioactivity. *Appl. Sci*. 2017;7:1330. DOI: 10.3390/app7121330
10. Saadaldin SA, Dixon SJ, Rizkalla AS. Bioactivity and biocompatibility of a novel wollastonite glass-ceramic biomaterial. *J Biomater Tiss Eng*. 2014;4:1-8. DOI:10.1166/jbt.2014.1261
11. Núñez-Rodríguez L, Encinas-Romero M, Gómez-Álvarez A, Valenzuela-García J, Tiburcio-Munive G. Evaluation of Bioactive Properties of  $\alpha$  and  $\beta$  Wollastonite Bioceramics Soaked in a Simulated Body Fluid. *J Biomater Nanobiotechnol*. 2018;9:263-276. DOI: 10.4236/jbnb.2018.93015

12. Wang C, Xue Y, Lin K, Lu J, Chang J, Sun J. The enhancement of bone regeneration by a combination of osteoconductivity and osteostimulation using  $\beta$ -CaSiO<sub>3</sub>/ $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> composite bioceramics. *Acta Biomater.* 2012; Jan;8(1):350-60. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.08.019
13. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res.* 2019;14;23-24. DOI: 10.1186/s40824-018-0149-3
14. Shim KS, Kim HJ, Kim SE, Park K. Simple surface biofunctionalization of biphasic calcium phosphates for improving osteogenic activity and bone tissue regeneration. *J Ind Eng Chem.* 2018;68:220- 228. DOI:10.1016/j.jiec.2018.07.048
15. Safronova TC, Selezneva II, Tikhonova SA, Kiselev AS, Davydova GA, Shatalova TB, Larionov DS, Rau JV. Biocompatibility of biphasic  $\alpha$ ,  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics in vitro. *Bioactive Materials.* 2020;5(2):423-427. DOI:10.1016/j.bioactmat.2020.03.007
16. Fortaleza LM, Alves AMM, Filho ALM, Ferreira DCL, Costa C, Viana V, et al. Raman spectroscopy analysis of bone regeneration in a rat model by implantation of a biocompatible membrane scaffold with and without LED photobiomodulation ( $\lambda$  945  $\pm$  20 nm). *Vibrational Spectroscopy.* 2020;111. DOI:10.1016/j.vibspec.2020.103154
17. Timchenko EV, Timchenko PE, Pisareva EV, Vlasov YM, Volova LT, Fedotov AA, et al. Optical analysis of bone tissue by Raman spectroscopy in experimental osteoporosis and its correction using allogeneic hydroxyapatite. *J. Opt. Technol.* 2020;87:161-167. DOI:10.1364/JOT.87.000161
18. Mazón P, Ros-Tárraga P, Serena S, Meseguer-Olmo L, De Aza PN. In Vitro Bioactivity and Cell Biocompatibility of a Hypereutectic Bioceramic. *Symmetry,* 2019;3:355.
19. Borkowski L, Sroka-Bartnicka A, Polkowska I. et al. New approach in evaluation of ceramic-polymer composite bioactivity and biocompatibility. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409:5747–5755. DOI:10.1007/s00216-017-0518-0
20. Ember KJI, Hoeve MA, McAughtrie SL, Bergholt MS, Dwyer BJ, Stevens MM, Faulds K, Forbes SJ, Campbell CJ. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *NPJ Regen Med.* 2017;2:12. DOI:10.1038/s41536-017-0014-3
21. Agrawal G, Samal SK. Raman Spectroscopy for Advanced Polymeric Biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering.* 2018;4(4):1285-1299. DOI:10.1021/acsbiomaterials.8b00258
22. Lopes JH, Magalhães JA, Gouveia RF, Bertran CA, Motisuke M, Camargo SEA, et al. Hierarchical structures of  $\beta$ -TCP/45S5 bioglass hybrid scaffolds prepared by gelcasting. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016;62:10-23. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2016.04.028
23. De Aza PN, Guitián F, De Aza S. Bioeutectic: a new ceramic material for human bone replacement. *Biomaterials.* 1997;18(19):1285-1291. DOI: 10.1016/s0142-9612(97)00063-x

24. Arbez B, Libouban H. Behavior of macrophage and osteoblast cell lines in contact with the  $\beta$ -TCP biomaterial (beta-tricalcium phosphate). *Morphologie*. 2017;101(334):154-163. DOI: 10.1016/j.morpho.2017.03.006
25. Böhme N, Hauke K, Neuroth M, Geisler T. In situ Raman imaging of high-temperature solid-state reactions in the  $\text{CaSO}_4$ - $\text{SiO}_2$  system. *Int. J. Coal Sci. Technol.* 2019;6(2):247–259. DOI:10.1007/s40789-019-0252-7
26. Olivares M, Zuluaga MC, Ortega BLA, Murelaga BX, Alonso-Olazabal CA, Urteaga BM, et al. Characterisation of fine wall and eggshell Roman pottery by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* 2010;41:1543–1549. DOI:10.1002/jrs.2748
27. Partyka J, Leśniak M. Raman and infrared spectroscopy study on structure and microstructure of glass-ceramic materials from  $\text{SiO}_2$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ - $\text{Na}_2\text{O}$ - $\text{K}_2\text{O}$ - $\text{CaO}$  system modified by variable molar ratio of  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ . *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2016;152:82–91. DOI: 10.1016/j.saa.2015.07.045
28. Dorozhkin S. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials* (Basel). 2009;2(2):399–498. DOI:10.3390/ma2020399
29. Motisuke M, Mestres G, Renó CO, Carrodeguas RG, Zavaglia CAC, Ginebra MP. Influence of Si substitution on the reactivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;75:816-821. DOI:10.1016/j.msec.2017.02.099
30. Abd El Rahim SH, Melegy AA, Hamzawy EMA. Wollastonite-Pseudowollastonite from Silica Fume, Limestone and Glass Cullet Composite. *Interceram - International Ceramic Review.* 2017;66(6):232–236. DOI:10.1007/BF03401217
31. Li C, Li P, Zhang J, Pei F, Gong X, Zhao W, Yan B, Guo H. The Concurrent Sintering-Crystallization Behavior of Fluoride-Containing Wollastonite Glass-Ceramics. *Materials* (Basel). 2021;14(3):681. DOI:10.3390/ma14030681
32. Obeid M, Shukur M, Al-Majeed E. Characteristic of Wollastonite Synthesized from Local Raw Materials. *Inter Jour of EngineerTechnol.* 2014;4:426-429. DOI:10.5923/j.ijmc.20140404.01
33. Lin CC, Leung KS, Shen P, Chen SF. Elasticity and structure of the compounds in the wollastonite ( $\text{CaSiO}_3$ )- $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  system: from amorphous to crystalline state. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(1):5361. DOI: 10.1007/s10856-014-5361-7
34. Ningsih HS, Tannesia L, Chen HH, Shih SJ. Fabrication, Characterization and In Vitro Cytotoxicity of Mesoporous  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Using the Spray Drying Method. *Crystals.* 2021;11;252. DOI:10.3390/cryst11030252
35. Carrodeguas RG, De Aza S.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater.* 2011;7(10):3536-46. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.06.019



36. Frasnelli M, Sglavo VM. Effect of Mg(2+) doping on beta-alpha phase transition in tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. *Acta Biomater.* 2016;33:283-289. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.01.015
37. Buzatu A, Buzgar N. The Raman study of single-chain silicates. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Al. I. Cuza" din Iasi. Seria Geologie.* 2010. LVI. 107-125. Available from: [https://rruff-2.geo.arizona.edu/uploads/ASAUAICI\\_56\\_2010\\_107.pdf](https://rruff-2.geo.arizona.edu/uploads/ASAUAICI_56_2010_107.pdf)
38. Bozkurt D, Akarsu M, Akin I, Goller G. Phase analysis, mechanical properties and in vitro bioactivity of graphene nanoplatelet-reinforced silicon nitride-calcium phosphate composites. *J Asian Ceram Soc.* 2021;9(2):471-486. DOI:10.1080/21870764.2021.1891664
39. Ohlin CA, Villa EM, Rustad JR, Casey WH. Dissolution of insulating oxide materials at the molecular scale. *Nature Materials.* 2009; 9(1):11-19. DOI:10.1038/nmat2585
40. Zhao J, Liu Y, Wei-Bin S, Xuebin Y. First detection, characterization, and application of amorphous calcium phosphate in dentistry. *J Dent Sci.* 2012;7(4):316-323. DOI: 10.1016/j.jds.2012.09.001
41. Wang C, Xue Y, Lin K, Lu J, Chang J, Sun J. The enhancement of bone regeneration by a combination of osteoconductivity and osteostimulation using  $\beta$ -CaSiO<sub>3</sub>/ $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> composite bioceramics. *Acta Biomater.* 2012;8(1):350-60. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.08.019
42. Shim KS, Kim HJ, Kim SE, Park K. Simple surface biofunctionalization of biphasic calcium phosphates for improving osteogenic activity and bone tissue regeneration. *J Ind Eng Chem.* 2018;68:220- 228. DOI:10.1016/j.jiec.2018.07.048
43. De Aza PN, Rodríguez MA, Gehrke SA, Maté-Sánchez de Val JE, Calvo-Guirado JL. A Si- $\alpha$ TCP Scaffold for Biomedical Applications: An Experimental Study Using the Rabbit Tibia Model. *Appl. Sci.* 2017;7:706. DOI:10.3390/app7070706
44. Szurkowska K, Szeleszczuk Ł, Kolmas J. Effects of Synthesis Conditions on the Formation of Si-Substituted Alpha Tricalcium Phosphates. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9164. DOI: 10.3390/ijms21239164
45. Tuck L, Sayer M, Mackenzie M, Hadermann J, Dunfield D, Pietak A, Stratilatov AD. Composition and crystal structure of resorbable calcium phosphate thin films. *J Mater Sci.* 2006;41(13):4273–4284. DOI: 10.1007/s10853-005-5532-5
46. Krz̄ała A, Kr̄uger B, Galuskina I, Vapnik Y, Galuskin E. Walstromite, BaCa<sub>2</sub>(Si<sub>3</sub>O<sub>9</sub>), from Rankinite Paralava within Gehlenite Hornfels of the Hatrurim Basin, Negev Desert, Israel. *Minerals.* 2020;10(5):407. DOI:10.3390/min10050407
47. Paluszkiewicz C, Błażewicz M, Podporska J, Gumuła T. Nucleation of hydroxyapatite layer on wollastonite material surface: FTIR studies. *Vibrational Spectroscopy.* 2008;48(2):263–268. DOI:10.1016/j.vibspec.2008.02.020

48. Webler GD, Zapata MJM, Agra LC, Barreto E, Silva AOS, Hickmann JM, Fonseca EJS. Characterization and Evaluation of Cytotoxicity of Biphasic Calcium Phosphate Synthesized by a Solid State Reaction Route. *Current Applied Physics*. 2014;14(6):876-880. DOI:10.4322/2176-1523.20212358
49. Vani, R., Giriya, E.K., Elayaraja, K. *et al.* Hydrothermal synthesis of porous triphasic hydroxyapatite/( $\alpha$  and  $\beta$ ) tricalcium phosphate. *J Mater Sci: Mater Med*. 2009;20:43–48. DOI:10.1007/s10856-008-3480-8
50. Baradari H, Damia C, Dutreih-Colas M, Champion E, Chulia D, Viana M.  $\beta$ -TCP porous pellets as an orthopaedic drug delivery system: ibuprofen/carrier physicochemical interactions. *Sci Technol Adv Mater*. 2011;12(5):055008. DOI:10.1088/1468-6996/12/5/055008
51. Ruiz-Aguilar C, Alcántara-Quintana LE, Aguilar-Reyes EA, Olivares-Pinto U. Fabrication, characterization, and in vitro evaluation of  $\beta$ -TCP/ZrO<sub>2</sub>-phosphate-based bioactive glass scaffolds for bone repair. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr*. 2020; BSECV-248. DOI:10.1016/j.bsecv.2020.09.004
52. Tuschel D. Raman Spectroscopy and Polymorphism. *Spectroscopy*. 2019;34(3):10-21. Available from: <https://www.spectroscopyonline.com/view/raman-spectroscopy-and-polymorphism>
53. Rojbani H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res A*. 2011; 98:488-498. DOI: 10.1002/jbm.a.33117

## 8 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de biomateriais sintéticos com maiores potenciais osteogênicos, em relação àqueles atualmente empregados, despertou o interesse para a presente pesquisa. Até os dias atuais, ainda não se encontrou um biomaterial sintético ideal que possa ser aplicado como substituto para regeneração óssea. Por isso, a síntese das vitrocerâmicas com diferentes proporções percentuais em peso de W e TCP buscou reunir reconhecidas propriedades favoráveis à osteogênese, para obter diferentes taxas de dissolução, biodegradação e biorreabsorção *in vivo*. Nessa premissa, almejou-se que, durante a regeneração óssea, os biomateriais fossem substituídos de forma gradual pelo novo tecido ósseo, com as mesmas características morfológicas do tecido ósseo nativo<sup>(5,145,146)</sup>.

Considerando tais aspectos, a presente pesquisa investigou o comportamento biológico, a composição, as fases estruturais e as modificações composicionais de vitrocerâmicas compostas de W e TCP, após a implantação em defeito ósseo crítico confeccionado cirurgicamente na calvária de rato, cujos resultados foram apresentados nos três artigos que compõem esta tese. No artigo intitulado: “*Analysis of the behavior of a biomaterial based on wollastonite/TCP in the implant process of an experimental model of critical bone defects*”, constam os resultados do acompanhamento clínico dos grupos experimentais e das análises macroscópica e radiográfica. Os resultados demonstraram que as vitrocerâmicas com diferentes proporções de W e TCP foram bem toleradas pelos animais, com evolução satisfatória e ausência de sinais de reação inflamatória exacerbada e rejeição. Esses resultados estão em consonância com outros estudos que também empregaram W e TCP, como biomateriais experimentais para regeneração óssea<sup>(6,7,8,147,148)</sup>.

De acordo com Mhadhbi, Khliissa e Bouzidi (2021)<sup>(149)</sup>, a biocompatibilidade dos biomateriais não ocorre somente pelas interações químicas entre eles e o organismo receptor, mas envolve também aspectos físicos, como formato, tamanho, porosidade, molhabilidade, entre outros. Na presente pesquisa, muito embora o formato de grânulos com tamanhos entre 400 e 600 µm tenham possibilitado o preenchimento completo do defeito ósseo crítico, as vitrocerâmicas com diferentes proporções de W e TCP apresentaram comportamentos biológicos distintos, no que se refere à manutenção no sítio de implantação, a depender da proporção empregada, o que culminou no deslocamento dos grânulos para fora do defeito ósseo. As vitrocerâmicas com maiores percentuais em peso de W (W40/TCP60, W60/TCP40 e

W80/TCP20) demonstraram melhor molhabilidade no transoperatório, condição que facilitou o manuseio durante a implantação dos biomateriais e corresponderam ao menor deslocamento dos grânulos após implantação. Estes resultados estão de acordo com Núñez-Rodríguez (2018)<sup>(120)</sup> e Juraski e colaboradores (2017)<sup>(150)</sup>, que reportaram, em estudo *in vitro*, alta reatividade da W quando em contato com fluido corpóreo simulado. Já a vitrocerâmica W20/TCP80, com menor molhabilidade, apresentou maior dificuldade para o manuseio e a implantação no defeito ósseo crítico, bem como resultou em maior deslocamento dos grânulos após implantação.

De fato, análise radiográfica evidenciou diferentes padrões de deslocamento dos grânulos para fora do defeito ósseo, com maior ocorrência no grupo W20/TCP80. Sabe-se que biomateriais na forma de grânulos apresentam maior dificuldade de estabilidade após implantação em defeito ósseo crítico<sup>(151)</sup>. No entanto, os resultados do presente estudo indicam que a maior proporção de TCP na vitrocerâmica W20/TCP80 resultou em grânulos com menor habilidade para manutenção da estabilidade no local do implante. Tal comportamento é indesejável para um biomaterial com finalidade de regeneração óssea, pois faz-se necessário que o biomaterial permaneça temporariamente no sítio de implantação, enquanto a neoformação tecidual acontece<sup>(152)</sup>. Cabe ressaltar o estudo de Santos e colaboradores (2021)<sup>(5)</sup> demonstrou resultados positivos para regeneração óssea, utilizando um biomaterial na forma de *scaffolds*, desenvolvidos com 20% de W e 80% de TCP, evidenciando que formas tridimensionais porosas, podem conferir requisitos arquitetônicos necessários para maior estabilidade mecânica do biomaterial.

A análise macroscópica revelou formação e organização tecidual que envolveram os grânulos das vitrocerâmicas em todos os grupos experimentais. Tal resultado corrobora estudos anteriores que demonstram a habilidade desses biomateriais à base de W e TCP em integrar-se aos componentes biológicos recém-formados no sítio do implante<sup>(6,7,8,148)</sup>.

Conforme destacado, a composição molecular e estrutural de um biomaterial é determinante para o êxito na sua aplicação e finalidade. Considerando tais aspectos, o artigo intitulado: “*Compositional analysis and structural phases of glass-ceramics developed with different Wollastonite and TCP proportions using Raman spectroscopy*”, apresentou os resultados da análise das vitrocerâmicas W20/TCP80, W60/TCP40 e W80/TCP20, por meio da espectroscopia Raman, técnica que foi capaz de identificar a composição molecular e os polimorfos –  $\alpha$ -W,  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP –, por meio de bandas, cujas frequências evidenciaram os

modos vibracionais dos grupos moleculares<sup>(153)</sup>, fornecendo base para a avaliação do comportamento biológico, em modelo experimental *in vivo*.

Efetivamente, a espectroscopia Raman permitiu identificar os tipos de polimorfos nas vitrocerâmicas que se mostraram multifásicas, corroborando estudos anteriores que demonstraram capacidade de identificação e distinção dos modos de vibrações do grupo  $\text{SiO}_3$ , característico da  $\alpha$ -W, e dos modos vibracionais do grupo fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$ , característicos dos polimorfos  $\beta$ -TCP  $\alpha$ -TCP, em diferentes redes cristalinas<sup>(113,153)</sup>. A literatura reporta que os polimorfos do mesmo mineral têm os mesmos elementos químicos, no entanto, sabe-se que os diferentes polimorfos da W e do TCP apresentam diferentes comportamentos quando em contato com fluido tecidual<sup>(154)</sup>. Dessa forma, os diferentes perfis vibracionais Raman indicaram possíveis comportamentos *in vivo*, como rápida dissolução da fase  $\alpha$ -W e permanência dos polimorfos  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -TCP por maior período, após implantação, com liberação de diferentes quantidades dos íons silício, cálcio e fosfato, no sítio dos implantes.

Assim sendo, o artigo intitulado: “*Raman spectroscopy analysis of wollastonite/TCP glass-ceramics after implantation in critical bone defect in rats*”, apresenta a análise das modificações composicionais das vitrocerâmicas em diferentes pontos biológicos, após implantação em defeito ósseo crítico em calvária de rato. Os resultados da espectroscopia Raman, desta etapa, ao longo do período analisado, foram relacionados com o comportamento de dissolução, biodegradação e biorreabsorção dos polimorfos presentes nas vitrocerâmicas, bem como com a formação de componentes orgânicos e a presença de componentes inorgânicos no tecido recém-formado.

De acordo com Sola e Grima (2018)<sup>(155)</sup>, a  $\alpha$ -W apresenta rápida reação quando em contato com fluido biológico, pois sofre dissolução parcial da sílica, com consequente liberação de íons de cálcio e silício, ademais de formação de uma camada de hidrogel alcalino (sílica amorfo) em sua superfície, seguida de precipitação de apatita. Dessa forma, para a presente pesquisa, presumiu-se que, após a implantação *in vivo*, as vitrocerâmicas à base de W e TCP influenciariam o metabolismo celular local, estimulando mecanismos de angiogênese, síntese de colágeno e osteogênese<sup>(156)</sup>, ao mesmo tempo em que as fases  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP apresentassem taxas mais lentas de biodegradação (quando comparadas à W), com lenta liberação dos íons cálcio e de fosfato, permanecendo por maior tempo no organismo<sup>(157)</sup>.

Sabe-se que maiores estímulos para migração e diferenciação celular dos pré-osteoblastos em osteoblastos promoverá maior síntese de colágeno, principal componente da matriz

orgânica, que é precursora para a formação do tecido mineralizado ósseo<sup>(158)</sup>. No presente estudo, a vitrocerâmica W60/TCP40 promoveu formação de um novo tecido, que alcançou maior centralização em torno das bandas 1668 (amida I), 1454 (grupo metil), 1269 e 1247 (amida II), 1005 (fenilalanina), 877, 856 e 818  $\text{cm}^{-1}$  (prolina, hidroxiprolina e tirosina), características do colágeno, de acordo com outros estudos que avaliaram o processo de reparação/regeneração óssea por meio da espectroscopia Raman<sup>(158,159,160,161)</sup>. Ao longo dos pontos biológicos avaliados, o tecido recém-formado alcançou grande similaridade espectral com o grupo controle positivo – osso cortical normal, incluindo a centralização e a formação das bandas similares da fase mineral hidroxiapatita. Portanto, entende-se que a vitrocerâmica W60/TCP40 apresentou maior desempenho para a osteogênese entre as vitrocerâmicas em estudo. Ademais, recente estudo de Barbosa e colaboradores (2019)<sup>(10)</sup>, usando modelo experimental de defeito ósseo, também concluiu que uma biocerâmica à base de  $\alpha$ -W e  $\beta$ -TCP, na forma de *scaffolds*, com proporção percentual em peso de W60/TCP40, foi biocompatível e promoveu formação óssea, o que foi corroborado pelos resultados desta pesquisa.

A vitrocerâmica W80/TCP20 também promoveu formação de um novo tecido, porém, as bandas Raman, características dos componentes orgânicos, apresentaram-se com intensidades fracas ou muito fracas ao longo dos pontos biológicos avaliados. Aos 120 dias, os resultados espectrais demonstraram quantidade/qualidade da formação de tecido mineral inferior ao obtido com o implante da vitrocerâmica W60/TCP40. Embora a literatura não apresente uma quantidade ideal para saturação de íons de silício e osteogênese, na presente pesquisa é razoável associar que a quantidade de íons liberados por meio da dissolução da  $\alpha$ -W interferiu nos potenciais de osteogênese das vitrocerâmicas em estudo.

Recentemente, Uribe e colaboradores (2020)<sup>(125)</sup> investigaram *in vitro* efeitos osteogênicos com células tronco do folículo dentário em fluido corpóreo simulado, com diferentes concentrações de silício, concluíram que a solução com 25  $\mu\text{g/ml}$  de silício teve efeito significativo para osteogênese. Já as soluções com concentrações  $< 25 \mu\text{g/ml}$  e  $> 75 \mu\text{g/ml}$  de silício não apresentaram efeitos significativos e as concentrações  $\geq 100 \mu\text{g/ml}$  apresentaram efeito inibitório para a osteogênese. Tais resultados *in vitro* podem ajudar a explicar os resultados obtidos na presente pesquisa com vitrocerâmicas. Embora as técnicas de análise empregadas para a avaliação das vitrocerâmicas *in vivo* não permitam quantificar os íons de silício liberados no sítio dos implantes, é razoável relacionar a vitrocerâmica com menor proporção de  $\alpha$ -W (W20/TCP80), com efeito não significativo para osteogênese (quantidade

insuficiente); e a vitrocerâmica com maior proporção de  $\alpha$ -W (W80/TCP20), com um efeito inibitório. Ainda de acordo com Uribe e colaboradores (2020)<sup>(125)</sup>, o efeito inibitório da osteogênese em altas concentrações de íons de silício ocorre devido à densificação, que forma pequenos polímeros menos biodisponíveis. Portanto, o baixo desempenho da vitrocerâmica W80/TCP20 pode ter ocorrido devido a uma maior liberação de íons de silício no sítio do implante, o que provavelmente causou efeitos negativos no desempenho para osteogênese.

Os resultados da espectroscopia FT-Raman nas amostras indicaram dissolução da fase  $\alpha$ -W logo aos sete dias após os implantes, visto que as bandas características dessa fase não são mais visualizadas a partir desse ponto biológico, corroborando a previsibilidade dos estudos *in vitro* <sup>(105,120,70)</sup>. Na presente pesquisa, a intenção de utilizar a  $\alpha$ -W como componente nas vitrocerâmicas baseou-se em estudos que demonstraram sua maior bioatividade em relação às cerâmicas de TCP, por meio da rápida dissolução e da liberação de íons de cálcio e de silício, além de proporcionar maior resistência mecânica, característica determinante para a estabilidade do implante no sítio ósseo. Os resultados da espectroscopia Raman confirmaram as diferentes taxas de solubilidade, correspondendo a:  $\alpha$ -W >  $\alpha$ -TCP >  $\beta$ -TCP. Cabe ressaltar que esse mecanismo também aumenta o tamanho dos poros nas fases residuais das vitrocerâmicas, promovendo espaço para formação do novo tecido ósseo.

No estudo de Costa-Rodrigues e colaboradores (2015)<sup>(162)</sup>, melhores respostas osteogênicas *in vitro* foram alcançadas em meio de cultura celular com concentrações de 25  $\mu$ M de silício, que corresponde à concentração fisiológica no plasma, após refeição, sendo o nível basal normal considerado entre 2 e 10  $\mu$ M<sup>(163)</sup>. No referido estudo, a presença de silício em baixas concentrações não afetou significativamente a apoptose, no entanto, concentrações > 25  $\mu$ M causaram um aumento significativo da morte celular, sendo considerado um efeito negativo direto nas células mesenquimais, com potenciais osteogênicos. Também, o estudo de Shie (2011)<sup>(164)</sup> demonstrou que, embora biocompatível, grandes quantidades de sílica podem induzir a morte celular. Portanto, esses estudos reforçam uma possível explicação para o baixo desempenho da vitrocerâmica W80/TCP20, sendo provavelmente a maior liberação de silício no sítio do implante, o que não favoreceu a síntese de colágeno e de tecido mineralizado.

Os resultados espectrais para a vitrocerâmica W20/TCP80 demonstraram baixo desempenho, com bandas Raman de intensidades muito fracas e permanência das bandas características da fase  $\beta$ -TCP, ao longo de todos os pontos biológicos avaliados, indicando que a vitrocerâmica se comportou como um biomaterial de preenchimento. O estudo de

Vasconcelos e colaboradores (2019)<sup>(165)</sup> avaliou, por meio de análises histomorfológica e histomorfométrica, a formação de novo tecido, após implantação de um biomaterial composto por  $\alpha$ -W e  $\beta$ -TCP, no formato grânulos, em defeito ósseo crítico em calvária de rato. No referido estudo, as amostras obtidas com implantação do biomaterial com 20% de  $\alpha$ -W e 80% de  $\beta$ -TCP não promoveu a formação de tecido ósseo no centro do defeito, corroborando com os achados espectrais da presente pesquisa. Diferentemente, Santos e colaboradores (2021)<sup>(8)</sup> concluíram que um biomaterial desenvolvido com a proporção de 20% W e 80% TCP, no formato de *scalffold*, demonstrou maior formação de tecido ósseo, quando comparado com as proporções 60% e 80% de W. Esses resultados possivelmente estão correlacionados com o formato do biomaterial utilizado por esses autores.

Referente às modificações composicionais associadas aos polimorfos minerais, os grupos experimentais W60/TCP40 e W80/TCP20 demonstraram permanência das bandas atribuídas às fases  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP (957 e 972  $\text{cm}^{-1}$ ), até 45 dias após os implantes. Aos 120 dias, a banda 972  $\text{cm}^{-1}$  é demonstrada somente no grupo W80/TCP20, como um ombro de intensidade fraca, indicando que houve taxa mais lenta para sua biodegradação. Sabe-se que o  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP dispõem de formulações químicas semelhantes, no entanto, têm diferenças nas estruturas cristalinas que promovem diferentes comportamentos *in vivo*<sup>(166)</sup>. Desta forma, os resultados encontrados estão de acordo com os demais estudos que verificaram o índice de solubilidade da fase  $\beta$ -TCP, menor que da fase  $\alpha$ -TCP, o que resulta num maior tempo de permanência do  $\beta$ -TCP no organismo receptor<sup>(137, 167, 168)</sup>.

A solubilidade e a biodegradação mais lentas das fases  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP proporcionaram a permanência do arcabouço no sítio dos implantes das vitrocerâmicas W60/TCP40 e W80/TCP20, característica importante para a adesão e a proliferação óssea local. Ademais, a solubilidade das fases do TCP possibilita a troca de íons de cálcio e de fosfato com o meio biológico, condição que estimula a migração celular osteogênica, redução da atividade osteoclástica pela dissolução contínua do cálcio, além de promover a adsorção de proteínas e a deposição de cálcio e fosfato na forma de hidroxiapatita, principal fase mineral do tecido ósseo<sup>(169)</sup>.

Diante dos promissores resultados encontrados nesta pesquisa, novos estudos que abranjam avaliações histomorfológica e histomorfométrica, assim como outros métodos de caracterização físico-química e imaginológicas, necessitam ser realizados com a finalidade de subsidiar futuras aplicações clínicas.



## 9 CONCLUSÃO

Os biomateriais avaliados neste estudo não evidenciaram sinais característicos de rejeição no sítio de implante;

As vitrocerâmicas com maiores proporções de W demonstraram melhor molhabilidade e facilidade de manuseio transoperatório, além de estabilidade no sítio de implantação;

A espectroscopia Raman identificou os polimorfos  $\alpha$ -W,  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP, com diferentes predominâncias para cada vitrocerâmica, que influenciaram nos diferentes comportamentos biológicos;

As vitrocerâmicas W60/TCP40 e W80/TCP20 apresentaram dissolução e biodegradação mais evidentes que a vitrocerâmica W20/TCP80;

Nas condições experimentais deste estudo, a vitrocerâmica W60/TCP40 alcançou espectro Raman semelhante ao observado no tecido ósseo do grupo controle, demonstrando melhor potencial para ser empregada com substituo ósseo.

## REFERÊNCIAS

1. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011;31(9):66. DOI:10.1186/1741-7015-9-66.
2. Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface.* 2009;6(Suppl 3):311-24. DOI:10.1098/rsif.2008.0448.
3. Colombo F, Sampogna G, Coccozza G, Guraya SY, Forgione A. Regenerative medicine: Clinical applications and future perspectives. *J Microsc Ultrastruct.* 2017;5(1):1-8. DOI:10.1016/j.jmau.2016.05.002.
4. Girón J, Kerstner E, Medeiros T, Oliveira L, Machado GM, Malfatti CF, Pranke P. Biomaterials for bone regeneration: an orthopedic and dentistry overview. *Braz J Med Biol Res.* 2021;54(9):e11055. DOI:10.1590/1414-431X2021e11055.
5. Iaquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, D'Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, Trombelli L, Barbanti-Brodano G, Martini F, Tognon M. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):618. DOI:10.3390/ijms20030618.
6. Santos GG dos, Meireles ECA, Miguel FB. Wollastonite/TCP composites for bone regeneration: systematic review and meta-analysis. *Cerâmica.* 2020;66:277–83. DOI:10.1590/0366-69132020663792926
7. Tang G, Liu Z, Liu Y, Yu J, Wang X, Tan Z, Ye X. Recent Trends in the Development of Bone Regenerative Biomaterials. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:665813. DOI:10.3389/fcell.2021.665813.
8. Gonçalves Dos Santos G, Borges Miguel IRJ, de Almeida Barbosa Junior A, Teles Barbosa W, Vieira de Almeida K, García-Carrodegua R, et al. Bone regeneration using Wollastonite/ $\beta$ -TCP scaffolds implants in critical bone defect in rat calvaria. *Biomed Phys Eng Express.* 2021;7(5). DOI:10.1088/2057-1976/ac1878.
9. Souza A, McNulty C, Camilli J, Bertran C, Motisuke M. Calcium phosphate cement plus 10% wollastonite whiskers: An in vivo study. *J Biomim Biomater Biomed Eng.* 2020;47:117–26. DOI:10.4028/www.scientific.net/JBBBE.47.117
10. Barbosa WT, de Almeida KV, de Lima GG, Rodriguez MA, Lia Fook MV, García-Carrodegua R et al. Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ $\beta$ -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020; 108(3):1107-16. DOI:10.1002/jbm.b.34462.
11. Yazdani A, Rezaie H, Ghassai H, Mahmoudian M. The effect of processing parameters on the hydrothermal synthesis of wollastonite at low pressure. *J Ceram Process Res.* 2013;14:12–6. Disponível em: <http://www.jcpr.or.kr/journal/issue/archives/014/01>

12. Ryu HS, Youn HJ, Hong KS, Chang BS, Lee CK, Chung SS. An improvement in sintering property of beta-tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate. *Biomaterials*. 2002;23(3):909-14. DOI:10.1016/s0142-9612(01)00201-0.
13. Xiong K, Shi H, Liu J, Shen Z, Li H, Ye J. Control of the dissolution of Ca and Si ions from CaSiO<sub>3</sub> bioceramic via tailoring its surface structure and chemical composition. *J Am Ceram Soc*. 2013; 96:691-6.
14. De Aza PN, Luklinska ZB, Anseau MR, Hector M, Guitián F, De Aza S. Reactivity of a wollastonite-tricalcium phosphate Bioeutectic ceramic in human parotid saliva. *Biomaterials*. 2000;21(17):1735-41. DOI:10.1016/s0142-9612(00)00058-2.
15. Dashnyam K, El-Fiqi A, Buitrago JO, Perez RA, Knowles JC, Kim HW. A mini review focused on the proangiogenic role of silicate ions released from silicon-containing biomaterials. *J Tissue Eng*. 2017;15(8):1-13. DOI:10.1177/2041731417707339.
16. Götz W, Tobiasch E, Witzleben S, Schulze M. Effects of Silicon Compounds on Biomineralization, Osteogenesis, and Hard Tissue Formation. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):117. DOI:10.3390/pharmaceutics11030117.
17. Guastaldi A, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim. Nova*. 2010; 33(6):1352-8. DOI:10.1590/S0100-40422010000600025>
18. Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl*. 2008; 23(3):197-212. DOI:10.1177/0885328208096798.
19. Yamada M, Shiota M, Yamashita Y, Kasugai S. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of alpha- and beta-tricalcium phosphate in block grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;82(1):139-48. DOI:10.1002/jbm.b.30715.
20. Sakka S, Bouaziz J, Ayed F B. Mechanical properties of biomaterials based on calcium phosphates and bioinert oxides for applications in biomedicine. In: Pignatello, R. (Ed.). *Advances in biomaterials science and biomedical applications*. IntechOpen. 2013. DOI:10.5772/53088
21. De Aza PN, Guitián F, De Aza S. Bioeutectic: a new ceramic material for human bone replacement. *Biomaterials*. 1997;18(19):1285-91. DOI:10.1016/s0142-9612(97)00063-x.
22. Lin, K., Lin, C., & Zeng, Y. (2016). High mechanical strength bioactive wollastonite bioceramics sintered from nanofibers. *RSC Advances*. 2016;6(17):13867-72. DOI:10.1039/c5ra26916d
23. Souza AC, McNulty C, Camilli JA, Bertran CA, Motisuke M. Calcium phosphate cement plus 10% wollastonite whiskers: An in vivo study. *J. Biomimetics, Biomater. Biomed. Eng*. 2020;47:117-26. DOI:10.4028/www.scientific.net/JBBBE.47.11

24. Rahaman MN, Day DE, Bal BS, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, Tomsia AP. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater.* 2011;7(6):2355-73. DOI:10.1016/j.actbio.2011.03.016
25. Chen FM, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci.* 2016;1(53):86-168. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004.
26. National Institutes of Health. Clinical applications of biomaterials. Consensus Development Conference Statement. 1982;4(5):1-19. Disponível em: <https://consensus.nih.gov/1982/1982Biomaterials034html.htm>
27. Ratner BD.; Zhang G. A history of biomaterials. In: Ratner BD et al. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine.* 4. ed. London: Elsevier Academic Press; 2013. p.1-83.
28. Isaac C, Ladeira PRS de, Rêgo FMP do, Aldunate JCB, Ferreira MC. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Rev. Med.* 2010; 89(3-4):125-31. DOI:10.11606/issn.1679-9836.v89i3/4p125-131
29. Schmidt AH. Autologous bone graft: Is it still the gold standard? *Injury.* 2021;52(Suppl 2):18-22. DOI:10.1016/j.injury.2021.01.043.
30. Montoya C, Du Y, Gianforcaro AL, Orrego S, Yang M, Lelkes PI. On the road to smart biomaterials for bone research: definitions, concepts, advances, and outlook. *Bone Res.* 2021;9(1):12. DOI:10.1038/s41413-020-00131-z.
31. Vieira A, Teixeira-Pimentel I, Carvalho O, Henriques B, Silva F, Bousbaa H et al. Biomateriais sintéticos e xenógenos com alto potencial clínico para reparo tecidual. *RevSALUS.* 2019;1(2):17–23. DOI:10.51126/revsalus.v1i2.115
32. Tortora, G. J. *Princípios de anatomia e fisiologia.* Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016.
33. Mescher, A. L. *Junqueira's basic histology: Text and atlas.* 14th. New York: McGraw-Hill Education, 2016.
34. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int.* 2015; ID 421746: 17. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/421746/>
35. Schaffler MB, Kennedy OD. Osteocyte signaling in bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2012;10(2):118-25. DOI:10.1007/s11914-012-0105-4.
36. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(3):171-80. DOI:10.1615/critreveukargeneexpr.v19.i3.10.

37. Von Euw S, Wang Y, Laurent G, Drouet C, Babonneau F, Nassif N, Azaïs T. Bone mineral: new insights into its chemical composition. *Sci Rep.* 2019;9(1):8456. DOI:10.1038/s41598-019-44620-6.
38. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2002;41(17):3130-3146. DOI:10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3130:AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1.
39. Kovacs CS. Bone metabolism in the fetus and neonate. *Pediatr Nephrol.* 2014;29(5):793-803. DOI:10.1007/s00467-013-2461-4.
40. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2002;2(4):389-406. DOI:10.1016/s1534-5807(02)00157-0.
41. Heaney RP. Calcium intake and disease prevention. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(4):685-93. DOI:10.1590/s0004-27302006000400014.
42. Reznikov N, Steele J, Fratzl P, Stevens M. A materials science vision of extracellular matrix mineralization. *Nat Rev Mater.* 2016;1(8)16041. DOI:10.1038/natrevmats.2016.41.
43. Conigrave AD. Regulation of calcium and phosphate metabolism. In: Licata A, Lerma E. *Diseases of the parathyroid glands.* New York: Springer; 2012. p. 13-51. DOI:10.1007/978-1-4419-5550-0\_2
44. DiMeglio LA, Imel EA. Calcium and phosphate: Hormonal regulation and metabolism. In: David B. Burr, Matthew R. Allen. *Basic and applied bone biology.* Indianapolis. Academic Press. 2014. p. 261-82. DOI:10.1016/B978-0-12-416015-6.00013-7.
45. Szurkowska K, Szeleszczuk Ł, Kolmas J. Effects of synthesis conditions on the formation of si-substituted alpha tricalcium phosphates. *Int J Mol Sci.* 2020;1;21(23):9164. DOI: 10.3390/ijms21239164.
46. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(3):131-9. DOI:10.2215/CJN.04151206.
47. Dey, Pinki. Bone mineralisation. In: Churchill DG, Sikirić MD, Čolović B, Milhofer HF. *Contemporary topics about phosphorus in biology and materials.* IntechOpen. 2020. DOI:10.5772/intechopen.92065
48. Friess W. Collagen--biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998;45(2):113-36. DOI:10.1016/s0939-6411(98)00017-4.
49. Fernández ME, Zorrilla-Cangas C, García-García R, Ascencio JA, Reyes-Gasga J. New model for the hydroxyapatite-octacalcium phosphate interface. *Acta Crystallogr B.* 2003;59(2):175-81. DOI:10.1107/s0108768103002167.
50. LeGeros RZ, Parsons JR, Daculsi G, Driessens F, Lee D, Liu ST et al. Significance of the porosity and physical chemistry of calcium phosphate ceramics. *Biodegradation-*

bioresorption. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;523:268-71. DOI:10.1111/j.1749-6632.1988.tb38519.x.

51. Gomes DS, Santos AMC, Nevez GA, Menezes RR. A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine. *Cerâmica.* 2019; 65(374):282-302. DOI:10.1590/0366-69132019653742706>.

52. Madupalli H, Pavan B, Tecklenburg MMJ. Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite. *J Solid State Chem.* 2017;255:27-35. DOI:10.1016/j.jssc.2017.07.025.

53. Nair AK, Gautieri A, Chang SW, Buehler MJ. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nat Commun.* 2013;4:1724. DOI:10.1038/ncomms2720.

54. Azoidis I, Cox SC, Davies OG. The role of extracellular vesicles in biomineralisation: current perspective and application in regenerative medicine. *J Tissue Eng.* 2018;2(9):1-11. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/2041731418810130>

55. Quan BD, Wojtas M, Sone ED. Polyaminoacids in biomimetic collagen mineralization: Roles of isomerization and disorder in polyaspartic and polyglutamic acids. *Biomacromolecules.* 2021;22(7):2996-3004. DOI:10.1021/acs.biomac.1c00402.

56. Allen MR, Burr DB. Mineralization, microdamage, and matrix: How bisphosphonates influence material properties of bone. *BoneKEY-Osteovision.* 2007;4(2):49-60. DOI:10.1138/20060248

57. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* 2018;55(3):308-27. DOI:10.1177/0004563218759371.

58. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater.* 2013;9(8):7591-621. DOI:10.1016/j.actbio.2013.04.012.

59. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011;9(1):66. DOI:10.1186/1741-7015-9-66.

60. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, Choong PF, Schuetz MA, Hutmacher DW. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions - A 21st century perspective. *Bone Res.* 2013;1(3):216-48. DOI:10.4248/BR201303002.

61. Fischer J, Kolk A, Wolfart S, Pautke C, Warnke PH, Plank C, Smeets R. Future of local bone regeneration - Protein versus gene therapy. *J Craniomaxillofac Surg.* 2011;39(1):54-64. DOI:10.1016/j.jcms.2010.03.016.

62. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6):551-5. DOI:10.1016/j.injury.2011.03.031.

63. Robbins SL. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2014.
64. Sheikh Z, Abdallah M-N, Hanafi AA, Misbahuddin S, Rashid H, Glogauer M. Mechanisms of in vivo degradation and resorption of calcium phosphate based biomaterials. *Materials*. 2015; 8(11):7913-25. DOI:10.3390/ma8115430
65. Colombo F, Sampogna G, Coccozza G, Guraya SY, Forgione A. Regenerative medicine: Clinical applications and future perspectives. *J Microsc Ultrastruct*. 2017;5(1):1-8. DOI:10.1016/j.jmau.2016.05.002.
66. Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface*. 2009;6(3)311-24. DOI:10.1098/rsif.2008.0448.focus.
67. Zhang K, Fan Y, Dunne N, Li X. Effect of microporosity on scaffolds for bone tissue engineering. *Regen Biomater*. 2018;5(2):115-24. DOI:10.1093/rb/rby001.
68. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*. 2017;125(5):315-37. DOI: 10.1111/eos.12364.
69. Dashnyam K, El-Fiqi A, Buitrago JO, Perez RA, Knowles JC, Kim HW. A mini review focused on the proangiogenic role of silicate ions released from silicon-containing biomaterials. *J Tissue Eng*. 2017;8:2041731417707339. DOI:10.1177/2041731417707339.
70. Liu X, Ding C, Chu PK. Mechanism of apatite formation on wollastonite coatings in simulated body fluids. *Biomaterials*. 2004;25(10):1755-61. DOI:10.1016/j.biomaterials.2003.08.024.
71. Velasco MA, Narváez-Tovar CA, Garzón-Alvarado DA. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Res Int*. 2015;2015:729076. DOI:10.1155/2015/729076.
72. Almeida RS, Ribeiro, IÁ, da Silva MHP, da Rocha DN, Miguel FB, Rosa FP. Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após implantação de biomateriais. *Rev. Ciênc. Méd. Biol*. 2014;13(3):33136. DOI:10.9771/cmbio.v13i3.12940
73. Matassi F, Nistri L, Chicon Paez D, Innocenti M. New biomaterials for bone regeneration. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2011;8(1):21-4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3230919/pdf/ClinicalCases-8-0021.pdf>
74. Coathup MJ, Cai Q, Campion C, Buckland T, Blunn GW. The effect of particle size on the osteointegration of injectable silicate-substituted calcium phosphate bone substitute materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(6):902-10. DOI:10.1002/jbm.b.32895.

75. Eweida A, Schulte M, Frisch O, Kneser U, Harhaus L. The impact of various scaffold components on vascularized bone constructs. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(6):881-90. DOI:10.1016/j.jcms.2017.02.016.
76. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004;17(5):536-43.
77. Wang L, Wang C, Wu S, Fan Y, Li X . Influence of the mechanical properties of biomaterials on degradability, cell behaviors and signaling pathways: current progress and challenges. *Biomater Sci.* 2020;8(10):2714-33. DOI:10.1039/d0bm00269k.
78. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater.* 2005;4(7):518-24. DOI:10.1038/nmat1421
79. Abbasi N, Hamlet S, Love R, Nguyen N-T. Porous Scaffolds for Bone Regeneration. *J Sci-Adv Mater Dev.* 2020;5(1):1-9. DOI:10.1016/j.jsamd.2020.01.007.
80. Chanes-Cuevas O, Pérez-Soria A, Cruz-Maya I, Guarino V, Alvarez-Perez M. Macro-, micro- and mesoporous materials for tissue engineering applications. *AIMS Materials Science.* 2018;5:1124-40. DOI:10.3934/mat.2018.6.1124.
81. Monção MM; Rosa FP. Estudo das propriedades físicas de um biomaterial com nova composição de wollastonita e beta fosfato tricálcico para regeneração óssea após implante in vivo. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* 2019;18(2):239-48. DOI:10.9771/cmbio.v18i2.29316
82. Castro JAV, Aristizabal OLP, Alves EGL, Louzada MJQ, Tôrres RCS, Vilorio MIV, et al. Biocerâmica de fosfato de cálcio nanoestruturada micro-macroporosa em grânulos de absorção rápida no preenchimento de defeito crítico em rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2018;70:797-805. DOI:10.1590/1678-4162-9242
83. Zhang K, Wang S, Zhou C, Cheng L, Gao X, Xie X et al. Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. *Bone Res.* 2018;6:31. DOI:10.1038/s41413-018-0032-9.
84. Lim JY, Donahue HJ. Biomaterial characteristics important to skeletal tissue engineering. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004; 4(4):396-8.
85. Bobbert FSL, Zadpoor AA . Effects of bone substitute architecture and surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone. *J Mater Chem B.* 2017;5(31):6175-92. DOI:10.1039/c7tb00741h.
86. Liviu D, Popescu A, Zgura I, Preda N, Mihailescu I. Wettability of Nanostructured Surfaces. In: Aliofkhaezrai M (org.). *Wetting and Wettability.* cap. 8, IntechOpen. 2015; p. 207-52. DOI:10.5772/60808



87. Nakamura M, Hori N, Namba S, Toyama T, Nishimiya N, Yamashita K. Wettability and surface free energy of polarised ceramic biomaterials. *Biomed Mater.* 2015;10(1):011001. DOI:10.1088/1748-6041/10/1/011001.
88. Pires LA, de Meira CR, Tokuhara CK, de Oliveira FA, Dainezi VB, Zardin Graeff MS, et al. Wettability and pre-osteoblastic behavior evaluations of a dense bovine hydroxyapatite ceramics. *J Oral Sci.* 2020;62(3):259-64. DOI:10.2334/josnusd.19-0007.
89. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z, Boyan BD. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants. *Acta Biomater.* 2014;10(8):363-3371. DOI:10.1016/j.actbio.2014.03.037.
90. Brandão ML, Esposti TBD, Bisognin ED, Harari ND, Vidigal Jr GM, Conz MB. Superfície dos implantes osseointegrados X resposta biológica. *ImplantNews.* 2010;7(1): 95-101. Disponível em: [http://revodontobvsalud.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1677-38882015000400004](http://revodontobvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-38882015000400004)
91. Di Palma F, Guignandon A, Chamson A, Lafage-Proust MH, Laroche N, Peyroche S, Vico L, Rattner A. Modulation of the responses of human osteoblast-like cells to physiologic mechanical strains by biomaterial surfaces. *Biomaterials.* 2005;26(20):4249-57. DOI:10.1016/j.biomaterials.2004.10.041.
92. Sefton MV. Consensus Conference on Definitions Chester. *Biomaterials.* 1986;7. Disponível em: <https://ur.booksc.me/book/2639410/2cb8a1>
93. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomater.* 2008;29(20):2941–2953. DOI:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023
94. Montoya C, Du Y, Gianforcaro AL, Orrego S, Yang M, Lelkes PI. On the road to smart biomaterials for bone research: definitions, concepts, advances, and outlook. *Bone Res.* 2021;9(1):12. DOI:10.1038/s41413-020-00131-z.
95. Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *J Dent Res.* 2012;91(8):736-44. doi.org/10.1177/0022034511435260
96. Salgado P, Sathler P, Castro H, Alves G, Oliveira A, Oliveira R, et al. Bone Remodeling, Biomaterials And Technological Applications: Revisiting Basic Concepts. *J biomater Nanobiotechnol.* 2011;2:318-328. DOI:10.4236/jbnb.2011.23039
97. Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz JT, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(4):581-603. doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.009
98. Azevedo H, Reis RL. Understanding the enzymatic biodegradation of biodegradable polymers and strategies to control their biodegradation rate. In: Reis RL, San Román J. *Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine.* Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 177-201.

99. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24(24):4353-64. DOI:10.1016/s0142-9612(03)00339-9
100. Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone Grafts and substitutes in dentistry: A review of current trends and developments. *Molecules*. 2021;26(10):3007. DOI:10.3390/molecules26103007
101. Magallanes M, Luklinska Z, De Aza P, Carrodegua R, Peña P. Bone-Like Forming Ability of Apatite-Wollastonite Glass Ceramic. *J Eur Ceram Soc*. 2011;31:1549-61. DOI:10.1016/j.jeurceramsoc.2011.03.007
102. Huifeng S, Fu J, Dongshuang H, Xianyan Y, Jiajun X, Chunlei Y. 3D printing magnesium-doped wollastonite/ $\beta$ -TCP bioceramics scaffolds with high strength and adjustable degradation. *J Eur Ceram Soc*. 2016;36(6). DOI:10.1016/j.jeurceramsoc.2016.01.010
103. Santos G G dos, Borges MIRJ, Barbosa Junior A, Barbosa WT, Almeida KV de, García-Carrodegua R et al. Bone regeneration using Wollastonite/ $\beta$ -TCP scaffolds implants in critical bone defect in rat calvaria. *Biomed Phys Eng Express*. 2021;6(7). DOI:10.1088/2057-1976/ac1878
104. Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim Nova*. 2010;33(6):1352-8. DOI:10.1590/S0100-40422010000600025
105. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res*. 2019;23:4. DOI:10.1186/s40824-018-0149-3
106. Kim SE, Park K. Recent advances of biphasic calcium phosphate bioceramics for bone tissue regeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1250:177-88. DOI: 10.1007/978-981-15-3262-7\_12.
107. Kattimani DV, Kondaka S, Lingamaneni K. Hydroxyapatite Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone Tissue Regener*. 2016;7(9). DOI:10.4137%2FBTRIS36138
108. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000;31(4):37-47. DOI:10.1016/s0020-1383(00)80022-4
109. Ryu HS, Youn HJ, Hong KS, Chang BS, Lee CK, Chung SS. An improvement in sintering property of beta-tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate. *Biomaterials*. 2002;23(3):909-14. DOI:10.1016/s0142-9612(01)00201-0
110. Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl*. 2008;23(3):197-212. DOI:10.1177/0885328208096798

111. Matsunaga K, Kubota T, Toyoura K, Nakamura A. First-principles calculations of divalent substitution of Ca(2+) in tricalcium phosphates. *Acta Biomater.* 2015;23:329-37. DOI:10.1016/j.actbio.2015.05.014
112. Bohner M, Santoni BLG, Döbelin N.  $\beta$ -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater.* 2020;1;113:23-41. DOI:10.1016/j.actbio.2020.06.022
113. Motisuke M, Mestres G, Renó CO, Carrodegua RG, Zavaglia CAC, Ginebra MP. Influence of Si substitution on the reactivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;75:816-21. DOI:10.1016/j.msec.2017.02.099
114. Azarov G, Maiorova E, Oborina M, Belyakov A. Wollastonite raw materials and their applications (a review). *Glass and Ceramics.* 1995;52(9):237-40. DOI:10.1007/BF00681090
115. Demidenko N, Podzorova L, Rozanova V, Skorokhodov V, Shevchenko V. Wollastonite as a New Kind of Natural Material (A Review). *Glass and Ceramics.* 2011;58:308-11.
116. Milani S, Comboni D, Lotti P, Fumagalli P, Ziberna L, Maurice J, et al. Crystal Structure Evolution of CaSiO<sub>3</sub> Polymorphs at Earth's Mantle Pressures. *Minerals.* 2021;11:1-14. DOI:10.3390/min11060652
117. Virta R, Gosen, BV. Mineral resource of the month: wollastonite USGS Publications Warehouse. Disponible em: [http://www.geotimes.org/sept07/article.html?id=nn\\_wollastonite.html](http://www.geotimes.org/sept07/article.html?id=nn_wollastonite.html)
118. Bedeleian I, Ivan I, Stamatakis M, Duca V, Dana L, Horea B et al. The production of synthetic wollastonite and diopside by using silica-rich natural raw materials. *Tile & Brick International.* 2000;16:82-7.
119. Yazdani A, Rezaie H, Ghassai H, Mahmoudian M. The effect of processing parameters on the hydrothermal synthesis of wollastonite at low pressure. *J Ceram Process Res.* 2013;14:12-6.
120. Núñez-Rodríguez L, Encinas-Romero M, Gómez AA, Valenzuela J, Munive G. Evaluation of Bioactive Properties of  $\alpha$  and  $\beta$  Wollastonite Bioceramics Soaked in a Simulated Body Fluid. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2018;9(3)263–76. DOI:10.4236/jbnb.2018.93015
121. Maxim LD, McConnell EE. A review of the toxicology and epidemiology of wollastonite. *Inhal Toxicol.* 2005;17(9):451-66. DOI:10.1080/08958370591002030
122. Carrodegua RG, De Aza AH, De Aza PN, Baudín C, Jiménez J, López-Bravo A, Pena P, De Aza S. Assessment of natural and synthetic wollastonite as source for bioceramics preparation. *J Biomed Mater Res A.* 2007;83(2):484-95. DOI:10.1002/jbm.a.31216

123. Rondanelli M, Faliva MA, Peroni G, Gasparri C, Perna S, Riva A, Petrangolini G, Tartara A. Silicon: A neglected micronutrient essential for bone health. *Exp Biol Med* (Maywood). 2021;246(13):1500-11. DOI:10.1177/1535370221997072
124. Henstock JR, Canham LT, Anderson SI. Silicon: the evolution of its use in biomaterials. *Acta Biomater*. 2015;11:17-26. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.09.025.
125. Uribe P, Johansson A, Jugdaohsingh R, Powell JJ, Magnusson C, Davila M et al. Soluble silica stimulates osteogenic differentiation and gap junction communication in human dental follicle cells. *Sci Rep*. 2020;18;10(1):9923. DOI:10.1038/s41598-020-66939-1
126. Sun T, Wang M, Shao Y, Wang L, Zhu Y. The effect and osteoblast signaling response of trace silicon doping hydroxyapatite. *Biol Trace Elem Res*. 2018;181(1):82-94. DOI:10.1007/s12011-017-1031-1
127. Friederichs RJ, Brooks RA, Ueda M, Best SM. In vitro osteoclast formation and resorption of silicon-substituted hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(10):3312-22. DOI:10.1002/jbm.a.35470
128. Kokubo T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*. 1991;12(2):155-63. DOI: 10.1016/0142-9612(91)90194-f.
129. De Aza PN, Luklinska ZB, Anseau MR, Hector M, Guitián F, De Aza S. Reactivity of a wollastonite-tricalcium phosphate Bioeutectic ceramic in human parotid saliva. *Biomaterials*. 2000;21(17):1735-41. DOI:10.1016/s0142-9612(00)00058-2
130. Barbosa WT, de Almeida KV, de Lima GG, Rodriguez MA, Lia Fook MV, García-Carrodegua R, Amaro da Silva Junior V, de Sousa Segundo FA, de Sá MJC. Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ $\beta$ -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(3):1107-16. DOI:10.1002/jbm.b.34462
131. De A, Martin P, Gorni G. Glass-Ceramics: Improving glass properties through crystallization. *Crystals*. 2021;11(9):1084, 2021.
132. Ayala Valderrama D M, Cuaspud JAG, Taniolo N, Boccaccini, AR. Glass-ceramic materials obtained by sintering of vitreous powders from industrial waste: Production and properties. *Constr. Mater*. 2021;1:63-79. DOI:10.3390/constrmater1010004
133. Xin R, Zhang Q, Chen J, Leng Y. Effects of porosity and crystallinity of glass ceramics on the in vivo bioactive response. *Biomed Mater*. 2008;3(4):041001. DOI:10.1088/1748-6041/3/4/041001
134. Perić Kačarević Ž, Rider P, Alkildani S, Retnasingh S, Pejakić M, Schnettler R, Gosau M, Smeets R, Jung O, Barbeck M. An introduction to bone tissue engineering. *Int J Artif Organs*. 2020;43(2):69-86. DOI:10.1177/0391398819876286

135. Kokubo T, Shigematsu M, Nagashima Y, Tashiro M, Nakamura T, Yamamuro T et al. Apatite and wollastonite-containing glass-ceramics for prosthetic application. *Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University*. 1982; 60(3-4):260-8.
136. Santos GG, Meireles, ECA, Miguel FB. Wollastonite/TCP composites for bone regeneration: systematic review and meta-analysis. *Cerâmica*. 2020; 66:277–83. DOI:10.1590/0366-69132020663792926
137. Carrodeguas R, De Aza P. Main contributions to bioceramics by Salvador De Aza. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr*. 2011;50:219-28. DOI:10.3989/cyv.292011
138. Kim EJ, Bu SY, Sung MK, Choi MK. Effects of silicon on osteoblast activity and bone mineralization of MC3T3-E1 cells. *Biol Trace Elem Res*. 2013;152(1):105-12. DOI:10.1007/s12011-012-9593-4
139. Comesaña R, Lusquiños F, Del Val J, Quintero F, Riveiro A, Boutinguiza M, Jones JR, Hill RG, Pou J. Toward smart implant synthesis: bonding bioceramics of different resorbability to match bone growth rates. *Sci Rep*. 2015;2(5):10677. DOI:10.1038/srep10677
140. 112. GIL, A. C. Como elaborar projetos de pesquisa. São Paulo: Atlas; 2002
141. National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press; 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
142. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg*. 1982;196(1):100–9. DOI:10.1097/0000658-198207000-00020
143. Miguel FB, Cardoso AK, Barbosa AA Jr, Marcantonio E Jr, Goissis G, Rosa FP. Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006;78(2):334-9. DOI:10.1002/jbm.b.30492
144. Santos GGD, Vasconcelos LQ, Poy SCDS, Almeida RDS, Barbosa Júnior AA, Santos SRA, Rossi AM, Miguel FB, Rosa FP. Influence of the geometry of nanostructured hydroxyapatite and alginate composites in the initial phase of bone repair. *Acta Cir Bras*. 2019;34(2):e201900203. DOI:10.1590/s0102-8650201900203
145. Yu X, Tang X, Gohil SV, Laurencin CT. Biomaterials for bone regenerative engineering. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(9):1268-85. DOI:10.1002/adhm.201400760
146. Wei S, Ma JX, Xu L, Gu XS, Ma XL. Biodegradable materials for bone defect repair. *Mil Med Res*. 2020;7(1):54. DOI:10.1186/s40779-020-00280-6
147. Ge R, Xun C, Yang J, Jia W, Li Y. In vivo therapeutic effect of wollastonite and hydroxyapatite on bone defect. *Biomed Mater*. 2019;14(6):065013. doi: 10.1088/1748-605X/ab4238.

148. Saravanan S, Selvamurugan N. Bioactive mesoporous wollastonite particles for bone tissue engineering. *J Tissue Eng.* 2016;7:2041731416680319. DOI: 10.1177/2041731416680319.
149. Mhadhbi M, Khliissa F, Bouzidi C. Recent Advances in Ceramic Materials for Dentistry. In: Mhadhbi, M. *Advanced Ceramic Materials*. London: IntechOpen; 2021. Disponível: <https://www.intechopen.com/chapters/75967>.
150. Juraski A, Rodas A, Elsayed H, Bernardo E, Soares V, Daguano J. The in vitro bioactivity, biodegradation, and cytotoxicity of polymer-derived wollastonite-diopside glass-ceramics. *Materials.* 2017;10:425. DOI:10.3390/ma10040425
151. Meredith N. Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont.* 1998;11(5):491–501.
152. Mertens C, Braun S, Krisam J, Hoffmann J. The influence of wound closure on graft stability: an in vitro comparison of different bone grafting techniques for the treatment of one-wall horizontal bone defects. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019;21(2):284-91.
153. Pelletier MJ. Quantitative analysis using Raman spectrometry. *Appl Spectrosc.* 2003;57(1):20A-42A. DOI:10.1366/000370203321165133
154. Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl.* 2008;23(3):197-212. DOI:10.1177/0885328208096798
155. Sola D, Grima L. Laser machining and in vitro assessment of wollastonite-tricalcium phosphate eutectic glasses and glass-ceramics. *Mater Basel Switz.* 2018;11(1):E125. DOI:10.3390/ma11010125
156. Aza PN de, Luklinska ZB, Anseau M, Guitian F, Aza S de. Morphological studies of pseudowollastonite for biomedical application. *J Microsc.* 1996;182(1):24–31. DOI:10.1111/j.1365-2818.1996.tb04794.x
157. Zhou P, Xia D, Ni Z, Ou T, Wang Y, Zhang H, Mao L, Lin K, Xu S, Liu J. Calcium silicate bioactive ceramics induce osteogenesis through oncostatin M. *Bioact Mater.* 2020;6(3):810-22. DOI:10.1016/j.bioactmat.2020.09.018
158. Filho A, Amaral F, Martin A, Soares L. Evaluation of inorganic and organic bone components after application of an apatite-coated Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> implants as scaffolds for bone repair. *Braz Arch Biol Technol.* 2014;57:334-9. DOI:10.1590/S1516-89132014005000002
159. Omar O, Engstrand T, Kihlström Burenstam Linder L, Åberg J, Shah FA, Palmquist A et al. In situ bone regeneration of large cranial defects using synthetic ceramic implants with a tailored composition and design. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(43):26660-26671. DOI:10.1073/pnas.2007635117

160. Pinheiro ALB, Soares LGP, Marques AMC, Cangussú MCT, Pacheco MTT, Silveira L Jr. Biochemical changes on the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic micro-granular HA +  $\beta$ -tricalcium phosphate induced by laser and LED phototherapies and assessed by Raman spectroscopy. *Lasers Med Sci.* 2017;32(3):663-72. DOI:10.1007/s10103-017-2165-2
161. Ozaki H, Hamai R, Shiwaku Y, Sakai S, Tsuchiya K, Suzuki O. Mutual chemical effect of autograft and octacalcium phosphate implantation on enhancing intramembranous bone regeneration. *Sci Technol Adv Mater.* 2021;22(1):345-62. DOI:10.1080/14686996.2021.1916378
162. Costa-Rodrigues J, Reis S, Castro A, Fernandes MH. Bone anabolic effects of soluble si: In :Vitro studies with human mesenchymal stem cells and CD14+ osteoclast precursors. *Stem Cells Int.* 2016;2016:5653275. DOI:10.1155/2016/5653275
163. Bissé E, Epting T, Beil A, Lindinger G, Lang H, Wieland H. Reference values for serum silicon in adults. *Anal Biochem.* 2005;337(1):130-5. DOI:10.1016/j.ab.2004.10.034
164. Shie M-Y, Ding S-J, Chang H-C. The role of silicon in osteoblast-like cell proliferation and apoptosis. *Acta Biomater.* 2011;7(6):2604–14. DOI:10.1016/j.actbio.2011.02.023
165. Vasconcelos LQ. Análise físico-química e histomorfométrica do composto pseudowollastonita e  $\beta$ -fosfato tricálcico em diferentes concentrações após implantação in vivo para regeneração óssea. 2019. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.
166. Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl.* 2008 Nov;23(3):197-212. DOI:10.1177/0885328208096798
167. Li Y, Weng W, Tam KC. Novel highly biodegradable biphasic tricalcium phosphates composed of alpha-tricalcium phosphate and beta-tricalcium phosphate. *Acta Biomater.* 2007;3(2):251–4. DOI:10.1016/j.actbio.2006.07.003
168. Xie L, Yu H, Deng Y, Yang W, Liao L, Long Q. Preparation, characterization and in vitro dissolution behavior of porous biphasic  $\alpha/\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 59:1007–15. DOI:10.1016/j.msec.2015.11.040
169. Narayanan, R., Seshadri, S., Kwon, T., Kim, K. Calcium Phosphate-Based Coatings on Titanium and its Alloys. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater. Official J. Soc. Biomater.* 2008;85:279-99. DOI:10.1002/jbm.b.30932

## ANEXOS

## ANEXO A - Comitê de Ética no Uso de Animais




Universidade Federal da Bahia  
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)  
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Análise Histomorfométrica e Caracterização Físicoquímica do Composto Wollastonita/TCP após Implantação *in vivo* para Regeneração Óssea**”, registrada com o nº 128/2017, sob responsabilidade de Dra. Fabiana Paim Rosa - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei ° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS), em reunião de 19/01/2018.

Finalidade	( ) ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2017 – 01/01/2020
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus /Wistar
Número de animais	75
Peso/idade	300 a 450g; 3 a 4 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

  
Prof.ª Dra. Luciana Lyra Casais e Silva  
Coordenadora da CEUA-ICS  
Prof.ª Luciana Lyra Casais e Silva  
Coordenadora da CEUA-ICS  
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

Prof.ª Dra. Luciana Lyra Casais e Silva  
Coordenadora da CEUA-ICS



## ANEXO B - Carta de aceite para publicação - artigo 2

MSA: Acceptance Letter for Paper ID: 7702808

---

De: msa@scirp.org

Para: maurimitsuo@yahoo.com.br; isabelacbarreto@hotmail.com; fulviomiguel@yahoo.com.br;  
luiz.oliveira@uff.edu.br; rgcarrodeguas@gmail.com; rpcaraujo@hotmail.com

Data: terça-feira, 12 de abril de 2022 22:40 BRT

---

Dear Dr. Mauricio Mitsuo Moncao,

Greetings from Materials Sciences and Applications .

This is to inform you that your paper entitled "Raman spectroscopy analysis of wollastonite/TCP glass-ceramics after implantation in critical bone defect in rats" has been accepted for publication.

This manuscript will be ready for publication if the following three procedures can be completed **within a week:**

Step 1: Complete the Copyright Transfer

Step 2: Make Payment for Article Processing Charge (The payment information shown in your user center is the only correct and certified information; please do not be misled by other uncertified payment notification.)

Step 3: Revise the paper according to the comments on the system and Format it in our template, and Upload revised version in Word format through the system. Please highlight the revisions in red color in the updated version and send us a response letter on the comments if available. (The template and review comments are available on the system. Please send the reformatted file via email if the size of it is more than 4MB.)

Please login to the online system with your account and password to view all the information.

Please feel free to contact us if you have any question.

Best regards,

Managing Editor  
Martina Ma  
MSA Editorial Office

## ANEXO C - Submissão em periódico científico – artigo 3

## Brazilian Archives of Biology and Technology

**Preview (BABT-2022-0214)****From:** babt@tecpar.br**To:** maurimitsuo@yahoo.com.br**CC:** maurimitsuo@yahoo.com.br, isabelacbarreto@hotmail.com, luiz.oliveira@ufjf.edu.br, rpcaraujo@hotmail.com**Subject:** Brazilian Archives of Biology and Technology - Manuscript ID BABT-2022-0214**Body:** 24-Mar-2022

Dear Prof. Monção:

Your manuscript entitled "Compositional analysis and structural phases of glass-ceramics developed with different proportions of Wollastonite and TCP using Raman spectroscopy" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Brazilian Archives of Biology and Technology.

Your manuscript ID is BABT-2022-0214.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/babt-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/babt-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Brazilian Archives of Biology and Technology.

Sincerely,  
Brazilian Archives of Biology and Technology Editorial Office

**Date Sent:** 24-Mar-2022

## ANEXO D - Declaração da produção de capítulo de livro



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que **MAURÍCIO MITSUO MONÇÃO**, Doutor diplomado pelo Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, produziu o capítulo de livro intitulado: **“VITROCERÂMICAS À BASE DE WOLLASTONITA E FOSFATO TRICÁLCICO PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA”**, integrante do Livro **“Saúde e Reabilitação - o Ponto de Equilíbrio V. 1”**, em fase final de editoração. De mais a mais, a presente obra é chancelada pela EDUFBA (Editora da Universidade Federal da Bahia).

Salvador, 07 de abril de 2022

*Tarcísio Peralva Vivas*

Tarcísio Peralva Vivas

Secretário do Colegiado

Programa de Pós-Graduação

Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas

ANEXO E - Súmula do capítulo integrante do livro Saúde e Reabilitação – o Ponto de Equilíbrio V.1, submetido ao Conselho Editorial da EDUFBA (Editora da Universidade Federal da Bahia).

## **VITROCERÂMICAS À BASE DE WOLLASTONITA E FOSFATO TRICÁLCICO PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

**Autores**

*Mauricio Mitsuo Monção*

*Isabela Cerqueira Barreto*

*Roberto Paulo Correia de Araújo*

### **SÚMULA**

Novos biomateriais com melhores propriedades físicas, químicas e mecânicas para tratamento das extensas perdas ósseas continuam sendo um desafio para a bioengenharia. A literatura é ampla ao reportar a necessidade de superar as limitações dos tratamentos vigentes, mediante o desenvolvimento de biomateriais que excedam as tecnologias elementares de preenchimento do local lesionado e que sirvam de substituto ósseo capaz de promover regeneração óssea.

É notório o interesse dos pesquisadores nos minerais W (Wollastonita) e TCP (Fosfato tricálcico) como biomateriais sintéticos para aplicações biomédicas. Neste contexto, a busca por um substituto ósseo ideal levou ao desenvolvimento de vitrocerâmicas à base de W e TCP, que permitem reunir diferentes propriedades físico-químicas favoráveis à regeneração óssea em um sistema mineral, cujas pesquisas evidenciam notório potencial osteogênico.

O potencial osteogênico está associado diretamente com a obtenção dos polimorfos  $\alpha$ -W,  $\beta$ -W e  $\alpha$ -TCP por meio de sinterização. Cada polimorfo apresenta comportamento distinto quando em contato com fluido tecidual, de acordo com a organização da sua rede estrutural. Compreender tais comportamentos torna-se uma estratégia para o desenvolvimento de vitrocerâmicas à base de W e TCP, com potencial para diferentes taxas de dissolução, biodegradação e biorreabsorção, favorecendo especificamente cada etapa da reparação tecidual óssea.

A habilidade das vitrocerâmicas à base de W e TCP em apresentar diferentes comportamentos de dissolução, biodegradação e biorreabsorção, possibilita maior bioatividade logo após implantação em sítio ósseo, estimulando os mecanismos osteogênicos. Já a manutenção de fases minerais residuais ao longo da reparação óssea serve de arcabouço para a migração e adesão celular no local do implante, bem como atua como fonte dos íons cálcio e fosfato, importantes para a mineralização do novo tecido formado.

Embora a literatura reporte o potencial das vitrocerâmicas à base de W e TCP como substituo ósseo, novas pesquisas são necessárias, sobretudo, com diferentes formas de apresentações do biomaterial, bem como diferentes proporções percentuais em peso de cada mineral. Novas informações acerca do desempenho in vivo poderão direcionar o desenvolvimento das vitrocerâmicas à base de W e TCP com melhores ajustes à dinâmica de formação do novo tecido no local do implante.

## ANEXO F - Informações do fabricante

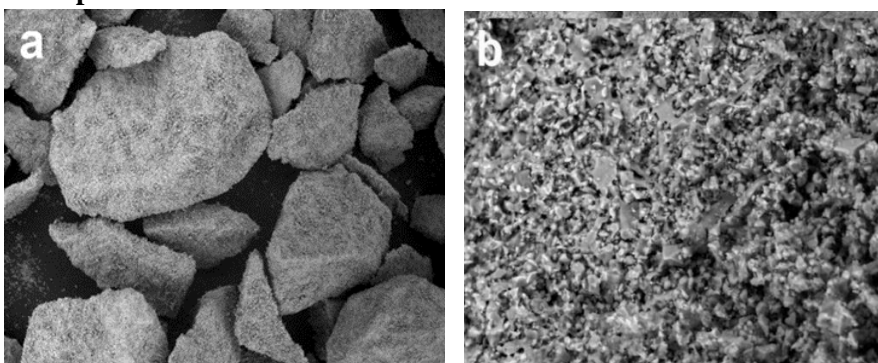
As informações a seguir procedem do fabricante das vitrocerâmicas experimentais.

**Tabela 1.** Quantidades de matérias primas, temperatura e tempo de patamar empregados na preparação dos materiais experimentais.

Material	Quantidades MP		Composição química esperada (% m/m)				Condições de sinterização	
	W (g)	TCP (g)	CaO	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Outros	T (°C)	t (min)
80-20	80,0	20,0	51,34	10,61	35,72	2,33	1250	5
60-40	60,0	40,0	48,25	31,87	17,89	1,99	1250	60
20-80	20,0	80,0	46,70	42,52	8,85	1,93	1250	180

Fonte: Carrodeguas, 2021.

### 2) Microscopia eletrônica de varredura



**Figura 1:** Imagens representativas de MEV da superfície dos grânulos das vitrocerâmicas. (a) 60x, e, (b) 1500x. Fonte: Carrodeguas, 2021.

### 3) Composição elementar, fases minerais e porosidade.

Tabela 2. Composição química e de fases dos materiais experimentais.

Material	Composição química (%-m/m)				Composição de fases (%-m/m)						Porosidade (%)	
	O	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Outros*	ps-W	W-2M	β-TCP	α-TCP	m	RW (%)	Inter	Intra
20-80	2,6	0,5	6,7	0,2	5	12	59	6	8	8,25	38	26
60-40	9,2	1,5	8,4	0,9	34	nd	25	nd	1	12,32	42	20
80-20	7,6	2,1	,2	1,1	42	nd	12	nd	4	12,65	44	17

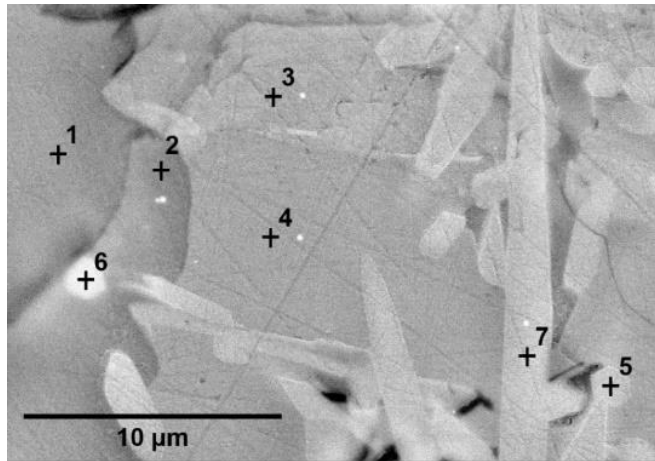
\* MgO+Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+K<sub>2</sub>O+Na<sub>2</sub>O+Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+TiO<sub>2</sub>

nd: não detectado; Am: fase amorfa

Rw: indicador da qualidade do ajuste do modelo Rietveld usado na determinação quantitativa de fases

Fonte: Carrodeguas, 2021.

4) Microestrutura das vitrocerâmicas



Spot No.	Si	P	Ca	Phase
1	25.55		32.41	ps-W
2	24.46		34.06	ps-W
3	2.35	19.28	35.18	Ca(PO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (SS)
4	24.53		33.97	ps-W
5	9.93	12.13	36.42	Amorphous (Glass)
6	14.87	10.22	32.01	Amorphous (Glass)
7	11.39	11.72	34.86	Amorphous (Glass)

Figura 2: Exemplar do grânulos 60-40.  
 Fonte: Carrodegua, 2021.

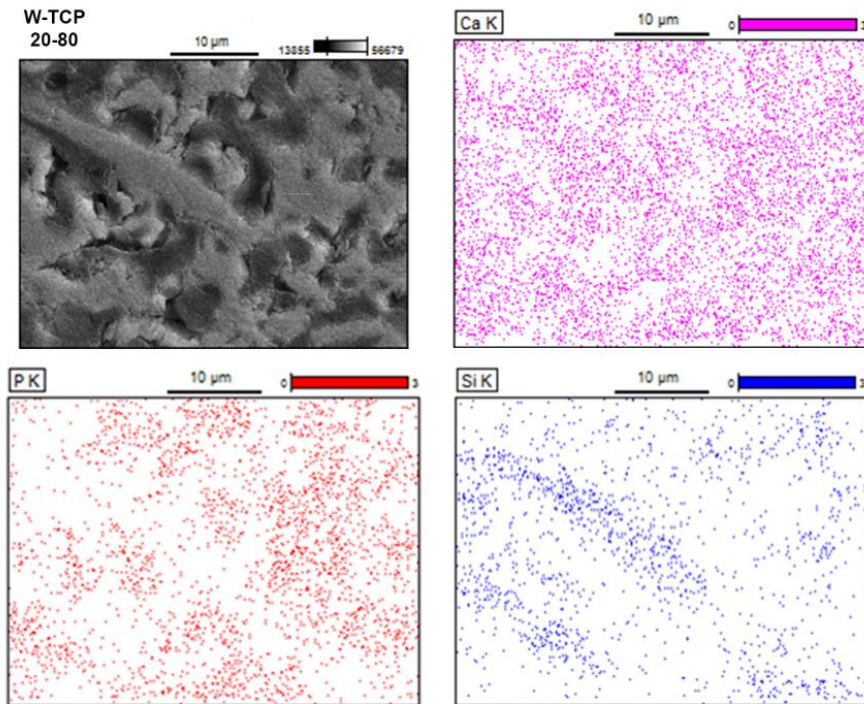
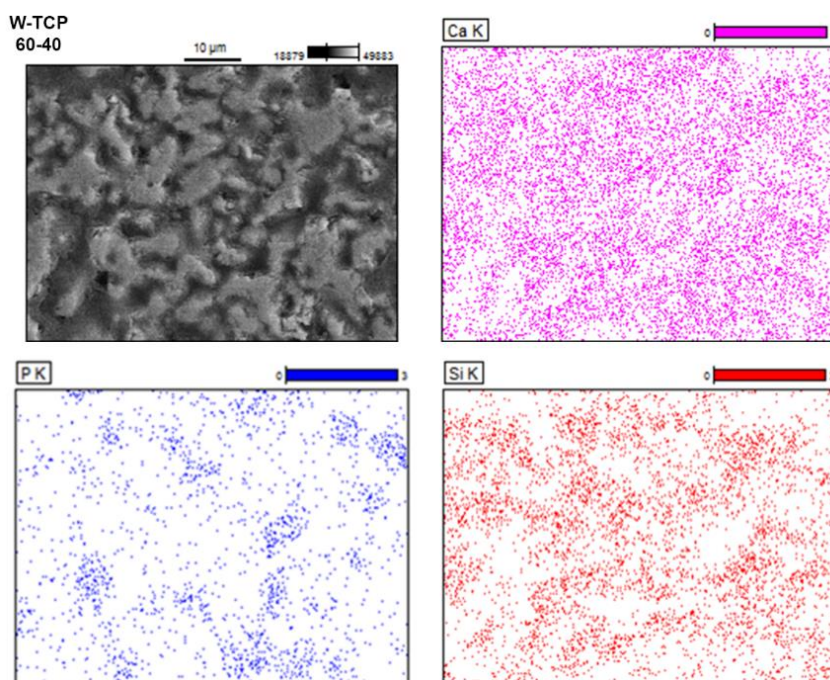


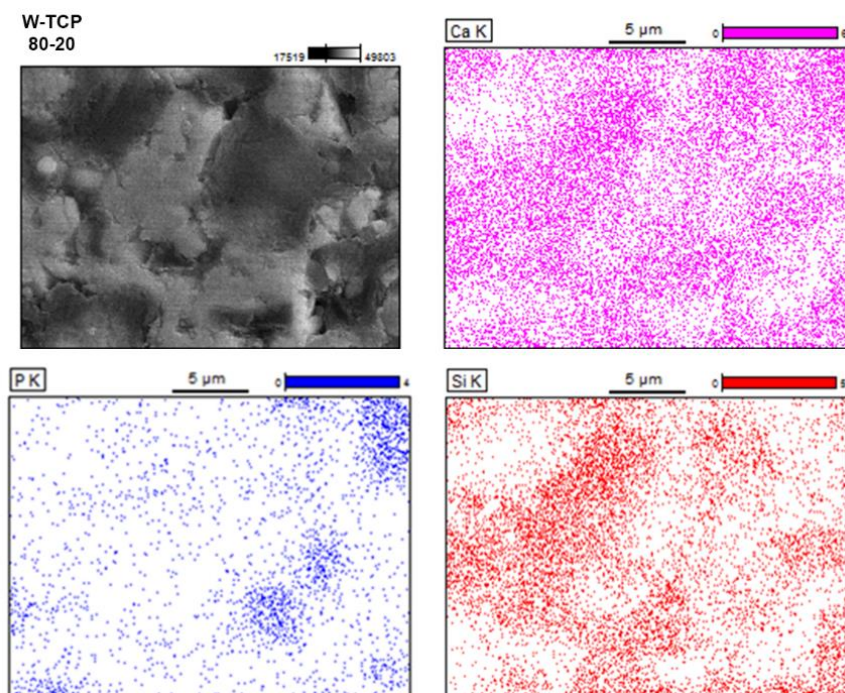
Figura 3: Imagem de MEV e mapeamento elemental do material 20-80 (amostra embutida em resina, polida e recoberta com Ag).  
 Fonte: Carrodegua, 2021.





**Figura 4:** Imagem de MEV e mapeamento elemental do material 60-40 (amostra embutida em resina, polida e recoberta com Ag).

**Fonte:** Carrodeguas, 2021.



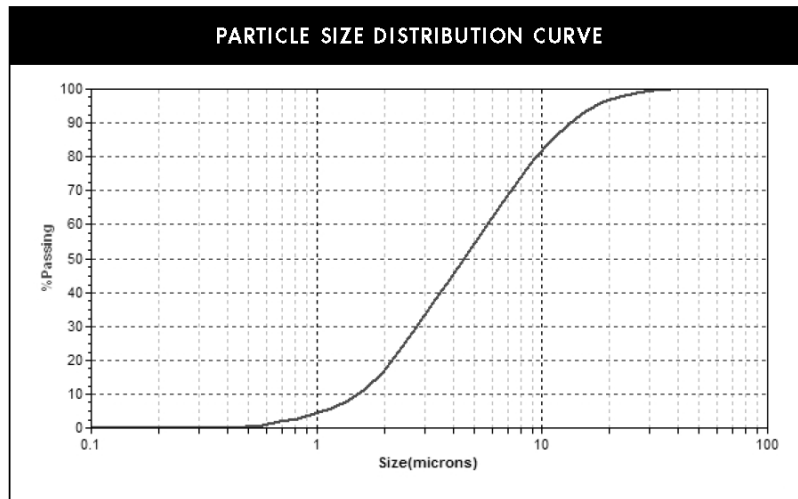
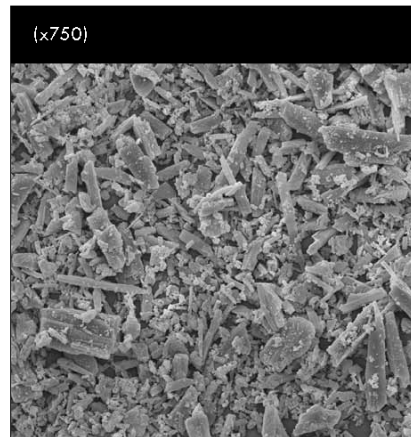
**Figura 4:** Imagem de MEV e mapeamento elemental do material 80-20 (amostra embutida em resina, polida e recoberta com Ag).

**Fonte:** Carrodeguas, 2021.

ANEXO G - Certificados de Análise das Matérias Primas

 Brand of the <b>S&amp;B</b> Group	<h1>Wollastonite</h1>
	<h2>NYAD® M1250</h2>

TYPICAL PROPERTY	TYPICAL VALUE
G. E. BRIGHTNESS	89
OIL ABSORPTION (lbs./100 lbs.)	27
FINENESS OF GRIND	6
BULK DENSITY	
LOOSE (lbs./cu.ft.)	39
(g/cc)	0.62
TAPPED (lbs./cu.ft.)	54.0
(g/cc)	0.87
MEDIAN PARTICLE SIZE (µm) (MICROTRAC)	4
SURFACE AREA (m <sup>2</sup> /g) (BET)	3.0
MINUS 400 U.S. MESH SCREEN (%)	100
MOISTURE (%)	0.15



[www.nycominerals.com](http://www.nycominerals.com)





# Wollastonite

## NYAD® M1250

- State-of-the-art processing operations
- World-class chemical modification technology
- Industry leader
- World-wide distribution network
- Customer-focused global technical support
- Premium quality wollastonite

Wollastonite is a naturally occurring mineral, is non-hazardous, and is not regulated by shipping agencies. Based upon toxicological studies, there is no evidence of any significant health risks to workers

#### NORTH AMERICAN OPERATION

P.O. Box 368, 803 Mountain View Dr.  
Willsboro, New York, 12996-0368 USA  
Tel.: 518-963-4262  
Fax: 518-963-1110

**ISO 9001/14001 CERTIFIED**

#### LATIN AMERICAN OPERATION

Hermosillo, Sonora, Mexico  
Tel.: 52-662-289-1000  
Fax: 52-662-289-1090

**ISO 9001/14001 CERTIFIED**

**For any further information,  
please contact:**

[info@nycominerals.com](mailto:info@nycominerals.com)

This data contains general information and describes typical properties only. It is offered for use by persons qualified to determine for themselves the suitability of our products for particular purposes. No guarantee is made or liability assumed, the application of this data and the products described herein being at the sole risk of the user.

TYPICAL PROPERTIES	VALUE
APPEARANCE	WHITE
MORPHOLOGY	ACICULAR
MOLECULAR WEIGHT	116
SPECIFIC GRAVITY	2.9
REFRACTIVE INDEX	1.63
pH (10% SLURRY)	9.9
WATER SOLUBILITY (g/100cc)	0.0095
DENSITY (lbs./cu. ft.)	181
BULKING VALUE (gal./lbs.)	0.0413
MOHS HARDNESS	4.5
COEFFICIENT OF EXPANSION (mm/mm/°C)	6.5 X 10 <sup>-6</sup>
MELTING POINT (°C) - theoretical	1540
MELTING POINT (°C) -by ASTM D1857	1410

CHEMICAL COMPOSITION: CaSiO <sub>3</sub>	
COMPONENT	TYPICAL VALUE (%)
CaO	44.94
SiO <sub>2</sub>	52.94
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.28
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.30
MnO	0.04
MgO	0.75
TiO <sub>2</sub>	0.05
K <sub>2</sub> O	0.23
Wt. Loss (1000°C)	0.47

**SIGMA-ALDRICH®**3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com**Certificate of Analysis**

**Product Name:** CALCIUM PHOSPHATE  
 purum p.a., >= 96.0 % KT calc. as Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

**Product Number:** 21218

**Batch Number:** BCBM7330V

**Brand:** Sigma-Aldrich

**CAS Number:** 7758-87-4

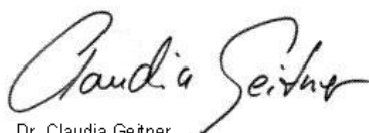
**Formula:** Ca<sub>3</sub>O<sub>3</sub>P<sub>2</sub>

**Formula Weight:** 310.18

**Quality Release Date:** 18 MAR 2014

**Recommended Retest Date:** JAN 2020

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO FAINTLY BEIGE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
TITRATION (KT) EDTA 0.1M	96.0 - 104.0 %	97.4 %
REMARKS ON TITRATION	CALC. AS CA3(PO4)2	CALC. AS CA3(PO4)2
LOSS ON IGNITION	≤ 0.1 %	0.1 %
METAL TRACE ANALYSIS (ICP)	CORRESPONDS TO REQUIREMENTS	PASSED
CADMIUM (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
COBALT (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
COPPER (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
IRON (ICP)	≤ 200 MG/KG	< 200 MG/KG
POTASSIUM (ICP)	≤ 100 MG/KG	< 100 MG/KG
SODIUM (ICP)	≤ 1000 MG/KG	< 1000 MG/KG
NICKEL (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
LEAD (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
ZINC (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
TOTAL SULFUR AS SO4 (ICP)	≤ 1000 MG/KG	< 1000 MG/KG
CHLORIDE (CL)	≤ 500 MG/KG	< 200 MG/KG
SULFATE (SO4)	≤ 1000 MG/KG	< 50 MG/KG



Dr. Claudia Geitner  
 Manager Quality Control  
 Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.



Instituto de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-graduação  
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas  
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100  
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>