

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Ciências/Campus de Bauru  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

*Ana Carolina da Silva*

# **Materiais híbridos de biovidros e raloxifeno para reparo alveolar**

**Bauru**

**2018**

ANA CAROLINA DA SILVA

Materiais híbridos de biovidros e raloxifeno para reparo alveolar.

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho.

Bauru

2018

Silva, Ana Carolina.

Materiais híbridos de biovidro e raloxifeno para reparo alveolar / Ana Carolina da Silva, 2018  
58 f.

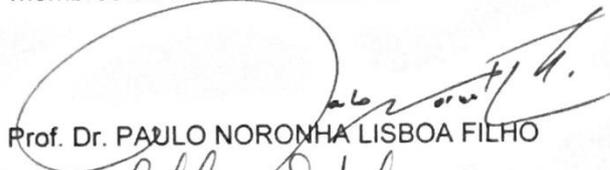
Orientador: Paulo Noronha Lisboa-Filho

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2018

1. Enxerto ósseo. 2. Biovidro. 3. Raloxifeno. 4. Sonoquímica. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Materiais híbridos de biovidro e raloxifeno para reparo alveolar.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ANA CAROLINA DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.**

Aos 04 dias do mês de maio do ano de 2018, às 15:00 horas, no(a) Anfiteatro da Seção Técnica de Pós Graduação - Faculdade de Ciências, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO - Orientador(a) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, Prof. Dr. JOEL FERREIRA SANTIAGO JUNIOR do(a) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade do Sagrado Coração - USC/Bauru, Prof. Dr. AROLDO GERALDO MAGDALENA do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ANA CAROLINA DA SILVA, intitulada **Materiais híbridos de biovidro e raloxifeno para reparo alveolar**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA.  
 ----- . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

  
 Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO

  
 Prof. Dr. JOEL FERREIRA SANTIAGO JUNIOR

  
 Prof. Dr. AROLDO GERALDO MAGDALENA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Isaura e Luiz Carlos, que sempre sonharam os meus sonhos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me abençoar diariamente.

Aos meus pais, Isaura e Luiz Carlos, pelo apoio e amor incondicional, para onde eu posso correr sempre que preciso.

Às minhas irmãs amadas, Ana Claudia e Maria Cecilia, meus sobrinhos queridos, Mayara, Thais, Vitor e Vinicius, e meus avós João e Ondina, por me ampararem todas as vezes que eu voltava para casa e precisava de atenção.

Ao meu querido orientador, professor Paulo, pelo aceite em me orientar, por me ajudar, aconselhar, por tudo o que me ensinou e por toda a paciência, especialmente em todas as vezes que eu disse que iria desistir e ele me aceitou de volta. Muito obrigada!

A d. Shirley Pinatto, pelo apoio e pelas inúmeras vezes em que me ajudou e se preocupou comigo. Uma pessoa incrível com quem aprendi muito e a quem serei sempre grata.

Aos meus colegas de laboratório, Luciana, Orisson, Erika, Bruna, Marcela e Igor, por me receberem tão bem, por toda a ajuda e paciência em me ensinar o que para mim era novo. Ao Léozinho, que se tornou um grande amigo, presente em momentos felizes e tristes, um ombro amigo com quem sempre pude contar dentro e fora do laboratório. Ao Odair, que mal chegou, mas que foi essencial para a finalização do meu trabalho, sempre paciente.

Ao professor Humberto e ao Nilton, pelo tempo que me receberam no Laboratório de Filmes Finos e por tudo o que me ensinaram.

A família Porcelanato: Lara, Henrique, Silvio e Mônica. Minha família em Bauru, que me acolheu, com quem pude contar quando tudo dava errado. Aqueles com quem passei noites em claro e que aguentavam meu mau humor. Sem vocês não teria sido tão bom como foi. Um agradecimento especial para o Henrique, por me fazer rir e estar comigo nas horas difíceis.

Aos meus queridos alunos e aos seus pais, pela confiança no meu trabalho e pelos bons momentos que já passamos juntos.

À professora Roberta Okamoto e ao Pedro, pela participação fundamental neste trabalho.

Ao CEPID da FAPESP.

Muito obrigada!

*Comece simples, mas comece!*

(Autor desconhecido)

DA SILVA, A. C. “**Materiais híbridos de biovidro e raloxifeno para reparo alveolar**”. 2018 Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais). UNESP, Bauru, 2018.

## **RESUMO**

Pesquisas científicas associadas à osseointegração promoveram grande avanço no tratamento para a reabilitação bucal com um prognóstico de sucesso superior a 90%. O fenômeno da osseointegração corresponde à conexão direta estrutural e funcional entre o tecido ósseo e o material do implante odontológico. O sucesso da osseointegração está associado primordialmente com a estabilidade primária durante o procedimento de instalação do implante e posteriormente com a estabilidade secundária após o procedimento. Altos índices de fracasso e perda de implantes têm sido atribuídos a implantes em osso de qualidade baixa e consequentemente com estabilidade diminuída, fato este recorrente em especial à pacientes com densidade mineral óssea (BMD) reduzida. Uma opção utilizada pela Implantologia é o uso materiais para enxerto ósseo, associado eventualmente à ingestão oral de fármacos que induzam a regeneração óssea. Os biovidros ativos são comumente utilizados como opção para enxertos, pois alegadamente promovem o crescimento ósseo. Dentre as opções de fármacos disponíveis no mercado farmacêutico, o Cloridato de Raloxifeno tem apresentado resultados satisfatórios quando comparado com a reposição hormonal à base de estrógeno ou ao uso de bifosfonatos de primeira geração.

Este projeto tem como motivação o desenvolvimento de um material híbrido a base do biovidro ativo comercial BioGran® (enxerto ósseo) e o fármaco comercial Raloxifeno®, sintetizado pela técnica sonoquímica estudados os efeitos de indução ao crescimento ósseo do tempo de sonicação do biovidro e também de diferentes concentrações em massa do fármaco em relação à massa do biovidro. Os resultados mostraram que a variável tempo de sonicação não resultou em diferenças significativas da diminuição do tamanho das partículas do biovidro. Também, os resultados indicaram que o grupo com 20% em massa de raloxifeno apresentou os melhores resultados de regeneração óssea.

**Palavras-chave:** enxerto ósseo; biovidro; raloxifeno; biomaterial; sonoquímica.

DA SILVA, A. C. “**Hybrid material prepared with bioglass and raloxifene for alveolar repair**”. 2018 Dissertation (Graduate Program in Science and Technology of Materials). UNESP, Bauru, 2018.

## **ABSTRACT**

Scientific research associated to osseointegration promoted a great advance in the treatment for oral rehabilitation with a success prediction of over 90%. The phenomenon of osseointegration corresponds to the direct structural and functional connection between the bone tissue and the material of the dental implant, and a determinant concept in osseointegration is the primary stability, sought after the implant installation procedure. High failure rates and implant loss have been attributed to poor quality bone implants and consequently decreased primary stability, especially in patients with reduced bone mineral density (BMD). One of the options used in the field of Implantology is the use of materials for bone grafting, associated with oral intake of drugs that induce bone regeneration. Active bio-biopsies are commonly used as an option for grafts because they allegedly promote bone growth. Among the drug options available in the pharmaceutical market, Raloxifene hydrochloride has shown satisfactory results when compared with estrogen-based hormone replacement or the use of first-generation bisphosphonates.

This project has as a motivation in the development of a hybrid material based on BioGran® commercial active bioglass (bone graft) and the commercial drug Raloxifeno®, synthesized by the sonochemical technique studied the effects of induction to the bone growth of the sonication time of the bioglass and also of different concentrations of the drug in relation to the mass of the bioglass. The results showed that the sonication time variable did not result in significant differences in the decrease of the bioglass particle size. Also, the results indicated that the group with 20% in mass of raloxifene presented the best results of bone regeneration.

**Keywords:** bone graft; bioglass; biomaterial; raloxifene; sonochemical.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Imagem ilustrativa de um osso normal e de um osso com osteoporose, disponível em < <a href="http://www.quadrilcirurgia.com.br/osteoporose.html">http://www.quadrilcirurgia.com.br/osteoporose.html</a> >. Acessado em 11/08/2017.....	16
<b>Figura 2</b> – Fórmula química do (a) Alendronato de sódio e (b) Cloridrato de raloxifeno .....	19
<b>Figura 3</b> – Esquema representativo da constituição histológica de uma zona do tecido ósseo compacto .....	20
<b>Figura 4</b> – Visualização do osso compacto e do osso esponjoso .....	21
<b>Figura 5</b> – Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea adaptado .....	22
<b>Figura 6</b> – Esquema do processo de diferenciação dos osteoclastos por intervenção direta dos osteoblastos através do sistema RANKL/RANK/OPG.....	23
<b>Figura 7</b> – Representação do mecanismo de formação de HAp na superfície de um Rbiovidro.....	29
<b>Figura 8</b> – Representação esquemática da montagem do equipamento Sonics VCX-750 para síntese da amostra.....	34
<b>Figura 9</b> – Cirurgia nos ratos no Modelo 1 e Modelo 2.....	36
<b>Figura 10</b> – Diagrama esquemático de um difratômetro de raios X onde T representa a fonte de raios X, S a amostra, C o detector e O o eixo ao redor do qual giram a amostra e o detector .....	38

<b>Figura 11</b> – Padrão de difração para uma amostra de chumbo.....	38
<b>Figura 12</b> – Geometria parafocal Bragg-Brentano.....	39
<b>Figura 13</b> – Difratoograma do <i>Biogran</i> <sup>®</sup> . Identificaram-se dois picos referentes a dióxido de silício - SiO <sub>2</sub> - (Ficha PCPDF 2-286) e silicato de cálcio – Ca <sub>3</sub> (Si <sub>3</sub> O <sub>9</sub> ) – (Ficha PCPDF 72-1396).....	42
<b>Figura 14</b> – Imagens de MEV do <i>BioGran</i> <sup>®</sup> puro sonicado para: 0 min (controle); 15 min; 30 min; 45 min; 90 min.....	43
<b>Figura 15</b> – Imagens de micro CT mostrando os defeitos perimplantares totalmente preenchidos após 30 dias dos grupos (a-b) 15 minutos; (c-d) 30 minutos; (e-f) 45 minutos e (f-g) 90 minutos.....	44
<b>Figura 16</b> – Efeito do tempo de sonicação do <i>BioGran</i> <sup>®</sup> puro em diferentes parâmetros .....	45
<b>Figura 17</b> – Imagens de micro CT mostrando os defeitos totalmente preenchidos após 60 dias dos grupos (a) CTR (b) RAL10 e (c) RAL20.....	46
<b>Figura 18</b> – Efeito da concentração de raloxifeno misturado com <i>BioGran</i> <sup>®</sup> sonicado por 15 minutos em diferentes concentrações.....	47
<b>Figura 19</b> – Imagens dos defeitos na calvária dos ratos com osso calcificado após serem preenchidos com biovidro e diferentes concentrações de raloxifeno dos grupos (a) CTR (b) RAL10 e (c) RAL20 .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos de amostras preparadas para estudo do efeito do tempo de sonicação.....	34
Tabela 2 – Grupos experimentais com diferentes concentrações de raloxifeno.....	35
Tabela 3 – Distribuição dos elementos (%) no defeito do osso da calota e das calvárias tratadas com misturas de <i>BioGran</i> ® e raloxifeno.....	47

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

DRX	Difração de raios X
EDS	Espectroscopia de energias dispersivas de raios X
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
HAp	Hidroxiapatita
OPG	Osteoprotegerina
I <sub>B</sub>	Índice de biocompatibilidade
SBF	Simulator body fluid
nm	nanômetros
kHz	Kilo-Hertz
MHz	mega-Hertz
g	gramas
$\lambda$	Comprimento de onda
d	Distância interplanar
n	Ordem de difração
$\theta$	Ângulo de difração
$\alpha$	Coeficiente de absorção óptica
$\beta$	Largura do pico de difração à meia altura do mesmo
SiO <sub>2</sub>	Dióxido de silício
Na <sub>2</sub> O	Óxido de sódio
CaO	Óxido de cálcio
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentóxido de difósforo
OH <sup>-</sup>	Hidroxila
Ca <sub>3</sub> (Si <sub>3</sub> O <sub>9</sub> )	Silicato de cálcio

## Sumário

1. Introdução e Motivação.....	16
2. Fundamentação teórica.....	19
2.1. Estrutura óssea.....	19
2.2. Remodelação óssea.....	22
2.3. Reparo ósseo.....	23
2.4. Enxerto ósseo.....	24
2.5. Biovidros.....	27
3. Objetivos.....	33
4. Materiais e Métodos.....	33
4.1. Sonoquímica.....	33
4.1.1. Síntese do biovidro.....	34
4.2. Testes <i>in vivo</i> .....	35
4.2.1. Cirurgias experimentais.....	36
4.3. Técnicas de caracterização.....	37
4.3.1. Difração de raios X.....	37
4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	40
4.3.3. Micro CT.....	40
5. Resultados e discussões.....	42
6. Conclusões.....	49
7. Referências.....	50

## 1. Introdução e Motivação

O fenômeno da osseointegração que corresponde à conexão direta estrutural e funcional entre o tecido ósseo e o implante (BRANEMARK et al, 1985; ALBREKTSON, 1989) promoveu grande avanço no tratamento para a reabilitação bucal, com um prognóstico de sucesso superior a 90% (CHIAPASCO et al, 2011; ANNIBALI et al, 2012; PEÑARROCHA-DIAGO et al, 2012). O sucesso da osseointegração está associado primordialmente com a estabilidade primária durante o procedimento de instalação do implante e posteriormente com a estabilidade secundária após o procedimento. Altos índices de fracasso e perda de implantes têm sido associados a implantes em osso de baixa qualidade e conseqüentemente com estabilidade diminuída (BRANEMARK et al, 1977; DAVIES, 2003). Um leito ósseo em condições ideais para implante muitas vezes não é encontrado na clínica. A instalação de implantes osseointegrados em alvéolos após a extração dental imediata, ou ainda, em áreas de qualidade e quantidade óssea deficientes como deiscências, fenestrações, defeitos verticais e perimplantares, constituem a grande parcela das condições clínicas encontradas no momento da avaliação e reabilitação oral do paciente (STENTZ et al, 1997). Situações como a sobrefresagem também levam cirurgiões dentistas a buscarem soluções para a falta de estabilidade primária do implante (QUEIROZ et al, 2012).

Para isso, é necessária uma integração entre os constituintes moleculares do sistema biológico e os átomos superficiais do biomaterial através da criação de uma interface entre a superfície do implante (titânio) e o tecido ósseo e, dependendo de seus desempenhos, a resposta final pode ser funcional ou não funcional. Com a resposta do tecido frente a uma superfície, ocorrem os processos de inflamação, cicatrização e adesão celular, diretamente influenciados pelas características ósseas do paciente. Disponibilidade de água, presença de íons, macromoléculas e células osteoclásticas são importantes para que a adequada regeneração óssea possa acontecer (JOHANSON, ALBREKTSON, 1987; IVANOFF et al, 2001).

Para que ocorra este processo, devem ser levados em consideração os padrões de formação óssea (BRANEMARK et al, 1977; DAVIES, 1998). A osteogênese de contato que implica em formação óssea em contato direto com a superfície do implante, e a osteogênese à distância, que implica na formação óssea à

partir das superfícies do leito ósseo remanescente os quais podem ser auxiliados pela interposição de biomaterial (DAVIES, 1998; GRUBER et al, 2016).

Diante destas situações, há a necessidade de avanços no campo das reconstruções, no sentido de preparar ou otimizar o leito receptor através de enxertos autógenos, xenógenos ou aloplásticos (DAVIES, 2003). Dentre os materiais aloplásticos, uma das opções é constituída de sílica como o *BioGran®*, que seus grânulos atuam como carreadores para fatores de crescimento ou na promoção de células de formação óssea. Ademais, foi demonstrado serem de fácil manipulação, além de serem altamente bioativo (FURUSAWA et al, 1997).

Além da quantidade, a qualidade do tecido ósseo é fator determinante para a adequada integração do implante dentário, tendo em vista que as características da micro-arquitetura óssea influenciam na habilidade do osso em suportar a transmissão e distribuição de forças fisiológicas (LEUNG et al, 2001; ISIDOR, 2006; TABATA et al, 2011). Neste contexto, quando o osso adquire uma estrutura cortical e/ou trabecular com menor densidade, a interface osso/implante é comprometida (SHAPURIAN et al, 2006; DRAGE et al, 2007), podendo ser observado nos quadros de osteopenia e osteoporose (YAMAZAKI et al, 1999, OZAWA et al, 2002).

Osteopenia é uma condição que antecede o quadro de osteoporose no qual a densidade mineral do osso é inferior ao normal (entre -1 e -2,5). Porém, apesar da diminuição da densidade óssea, a osteopenia não é considerada perigosa uma vez que nem sempre evolui para a osteoporose, em que a densidade mineral do osso está abaixo de -2,5. Quando a osteoporose ocorre, os poros no osso são muito maiores que o normal (Figura 1).

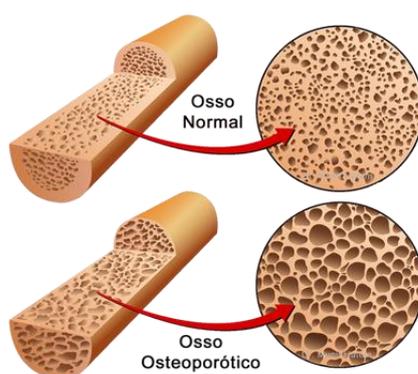


Figura 1 – Imagem ilustrativa de um osso normal e de um osso com osteoporose (Fonte: <http://www.quadrilcirurgia.com.br/osteoporose.html>)

Esta desordem do metabolismo ósseo é classicamente reconhecida como um problema de saúde significativo em mulheres, pela depleção no fornecimento de estrógeno na fase pós-menopausa, atingindo aproximadamente 2/3 desta população (KHOSLA et al, 2008; DRAKE et al., 2012). Entretanto, também é relatada nos homens, com maior incidência nos indivíduos acima de 50 anos de idade (KHOSLA et al, 2008; DRAKE et al, 2012; GIUSTI et al, 2014; LAWRENCE et al, 2017)

O estrógeno é um hormônio responsável por inúmeras ações fisiológicas, tendo várias atuações no organismo, entre elas o crescimento, a diferenciação e a função de muitos tecidos a partir de mecanismos que envolvem a interação entre uma molécula ligante e um receptor (AMADEL, 2006). Receptores estrogênicos foram encontrados predominantemente em osteoblastos (ERIKSEN, 1988; AMADEL, 2006), porém a principal atuação desse hormônio é na reabsorção óssea, podendo afetar a função osteoclástica e induzir a apoptose.

Para amenizar este quadro, durante muito tempo foi prescrito a reposição hormonal para tratar casos de osteoporose, no entanto a incidência de tumores e outros efeitos colaterais puseram fim a este conceito e novos medicamentos foram considerados (OKAMOTO, 2016).

Entre eles, os bifosfanatos de 2ª geração de uso oral, como o alendronato de sódio (Figura 2a), que promovem a apoptose das células osteoclásticas (OKAMOTO, 2016), exercendo ação anti-reabsortiva também na diferenciação e na replicação de pré-osteoclastos (LEITE, 1999). Considerou-se também os moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (SERMS), como o cloridrato de raloxifeno (Figura 2b), que não só desempenha um papel ideal para manter uma resposta favorável do tecido ósseo frente a condição de osteoporose e suas consequências, como também é uma opção de fármaco para tratamento de doenças cardiovasculares e para prevenção de câncer de mama (KAYATH, 1999). No osso, o raloxifeno aumenta a massa óssea, é eficaz em prevenir osteoporose em mulheres pós-menopausa a reduz a incidência de fraturas vertebrais em 50% em mulheres com osteoporose. Além disso, no sistema cardiovascular o raloxifeno reduz o colesterol total, LDL-colesterol, fibrinogênio e lipoproteína (KAYATH, 1999).

Apesar do alendronato ser um medicamento que apresenta benefícios, foi constatado que seu uso por mais de três anos pode causar osteonecrose (MORAIS,

2016). Já o raloxifeno apresentou efeitos colaterais como ondas de calor e tromboembolismo venoso (KAYATH, 1999), entretanto os benefícios de sua utilização ainda são considerados.

Este projeto tem como motivação o desenvolvimento de um material híbrido a base do biovidro ativo comercial BioGran® (enxerto ósseo) e o fármaco Raloxifeno, sintetizado pela técnica sonoquímica com diferentes concentrações do fármaco para que sejam uma alternativa no uso de enxertia óssea.

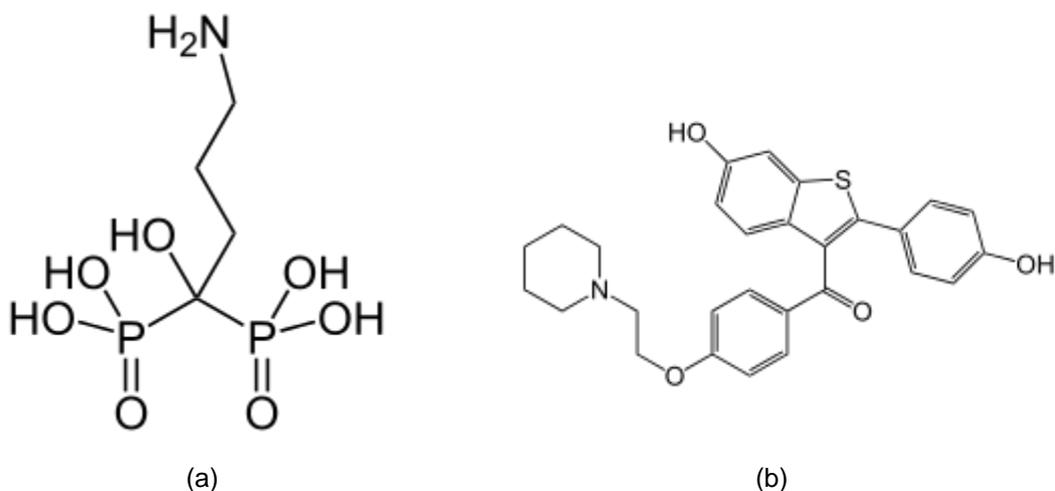


Figura 2 – Fórmula química do (a) Alendronato de sódio e (b) Cloridrato de raloxifeno (Fonte: [www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov))

## 2. Fundamentação teórica

### 2.1 Estrutura óssea

O tecido ósseo é uma substância viva com vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, composto por aproximadamente 30% de colágeno, 5% de fibras não colagenosas e 65% de mineral, principalmente cristais de hidroxiapatita (HAp),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (TEN CATE, 2001), podendo ser considerado uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo (ISOLA, 2012).

O osso pode ser dividido em cortical e trabecular. O osso cortical, ou compacto, que é denso e está presente no eixo de ossos longos onde a matriz de colágeno está organizada em forma de lamelas concêntricas ao redor de um canal vascular central constituindo o sistema de Havers. Os canais centrais, onde estão os nervos e vasos

sanguíneos comunicam-se entre si com a cavidade óssea através dos canais de Volkmann. A superfície óssea interna é revestida por uma membrana chamada perióstio e a superfície interna pelo endóstio, responsáveis por nutrir o osso e servir como fonte de osteoblastos para a osteogênese (KAPLAN e LIBRIANI, 1994) (Figura 3).

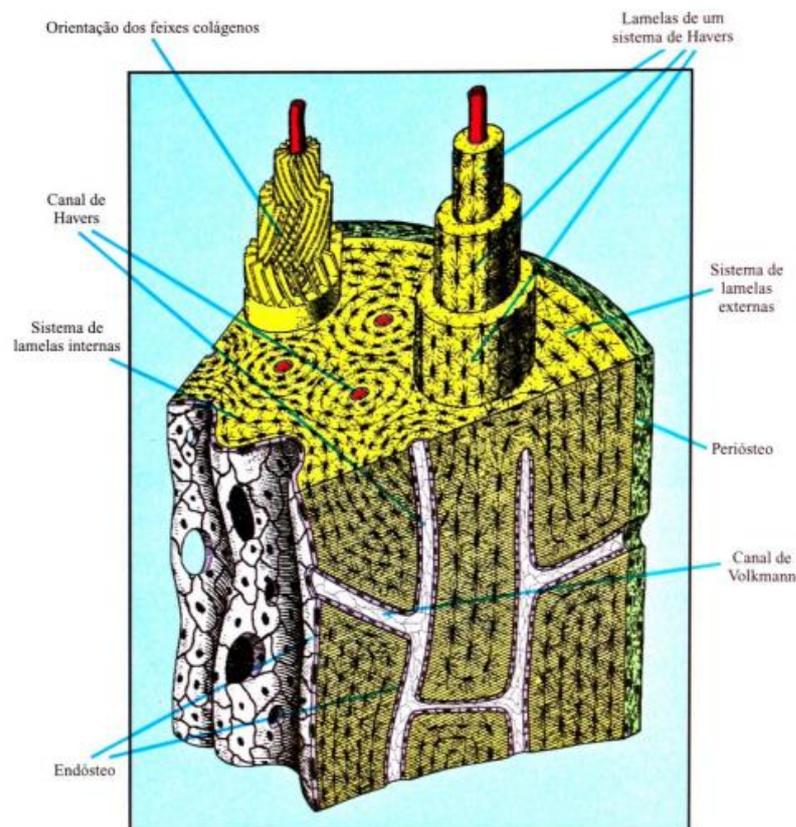


Figura 3 – Esquema representativo da constituição histológica de uma zona do tecido ósseo compacto (JUDAS, 2012)

O osso trabecular, ou esponjoso, apresenta uma matriz mais porosa e é organizada em trabéculas preenchidas por medula óssea vermelha, possuindo metabolismo mais intenso que o osso cortical por ter ativa produção de células sanguíneas (BETTI, 2004). A Figura 4 mostra a microestrutura óssea trabecular e cortical.

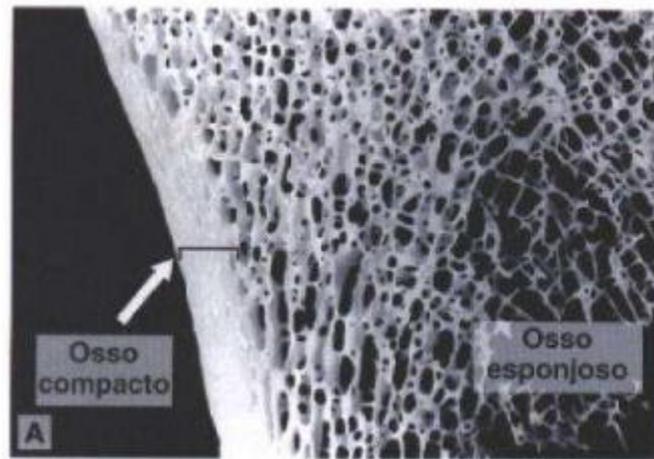


Figura 4 – Visualização do osso compacto e esponjoso (JUNQUEIRA, 2004)

Os principais tipos de células ósseas são os osteoblastos, osteoclastos e os osteócitos, todas derivadas na mesma linha de células osteoprogenitoras (LIRANI, 2004)

Os osteoblastos são células cúbicas e cilíndricas baixas, responsáveis não só pela formação da matriz óssea, mas também pela sua mineralização e aparecem com maior potencial na matriz óssea quando em áreas ricamente vascularizadas. As células osteoblásticas podem ser divididas em quatro subgrupos: pré-osteoblastos, osteoblastos maduros, células de revestimento ósseo e osteócitos. Os pré-osteoblastos apresentam capacidade reduzida de proliferação, mas adquirem características que marcam um fenótipo osteoblástico (JUDAS, 2012). Tornam-se maduras quando atingem a superfície óssea e quando em atividade as células se hipertrofiam e o núcleo se desloca para a extremidade mais distante da superfície óssea, são metabolicamente muito ativas e responsáveis pela síntese do colágeno tipo I (ISOLA, 2012; JUDAS, 2012).

Os osteócitos são osteoblastos maduros incorporados pela matriz óssea mineralizada que podem ser encontrados na superfície óssea, principalmente no endósteno e na superfície do periósteno. São células discoideias, achatadas, localizadas em lacunas. Seus prolongamentos citoplasmáticos entram em contato e formam junções comunicantes com prolongamentos de outros osteócitos no interior dos canaliculos (GARTNER e HIATT, 2002). A vida dos osteócitos depende do processo de difusão que permite a passagem de nutrientes e a vida da matriz óssea depende do osteócito. Quando o osso é danificado, há restrição dos osteócitos aos nutrientes,

levando à sua apoptose, que desencadeia processos de remodelação óssea (JUDAS, 2012).

Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas dos monócitos que desempenham função essencial na remodelação óssea e renovação do tecido ósseo (JUDAS, 2012). O processo de remodelação óssea é denominado osteoclasia (ISOLA, 2012). A cooperação entre osteoclastos e osteoblastos é responsável não só pela formação, remodelação e reparo do osso, mas pela manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo no organismo (JUDAS, 2012). O processo de formação, desenvolvimento e maturação dos osteoclastos englobam múltiplas etapas que serão vistos a seguir.

## 2.2 Remodelação óssea

A remodelação óssea é um mecanismo de substituição de áreas de tecido ósseo afim de preservar sua integridade, otimizar funções e prevenir a degradação óssea. No processo de remodelação, a formação e a reabsorção do tecido ósseo das células da linha osteoblásticas e osteoclásticas são atividades opostas, porém complementares. Assim, uma parte do osso velho é eliminada e substituída por um novo osso com pouca ou nenhuma alteração na massa óssea e o osso lamelar é substituído pelo osso imaturo (JUDAS, 2012).

O ciclo de remodelação óssea segue uma sequência ordenada de eventos que converte uma superfície em repouso em uma zona de remodelação, essa sequência pode ser identificada com as seguintes fases: ativação (A) → reabsorção (R) → formação (F) (Figura 5) que ocorre via RANKL/RANK/OPG (JUDAS, 2012).

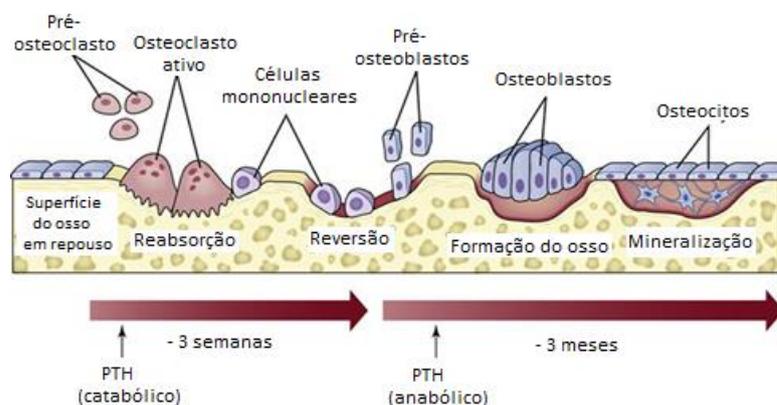


Figura 5 – Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea (Adaptado de JUDAS, 2012).

A fase de ativação (A) é o reconhecimento de uma área da superfície óssea e sua preparação para o processo de remodelação. Células pré-osteoclasticas são diferenciadas em células osteoclasticas. Na fase de reabsorção (R) os osteoclastos cavam no osso esponjoso lacunas irregulares que será preenchido pelos osteoblastos na fase de formação (F). Nesta fase ocorre a síntese da matriz osteóide e sua posterior mineralização, tendo como resultado final a reconstrução da lacuna óssea.

A diferenciação de células osteoblásticas em osteoclásticas durante a remodelação ocorre devido a produção de RANKL e RANK. O RANKL ao ligar-se com o receptor RANK desencadeia a maturação e ativação dos osteoclastos que iniciam a fase de reabsorção. Como consequência da atividade dos osteoclastos, a matriz óssea começa a liberar fatores de crescimento responsáveis pela proliferação e diferenciação dos pré-osteoblastos (Figura 6).

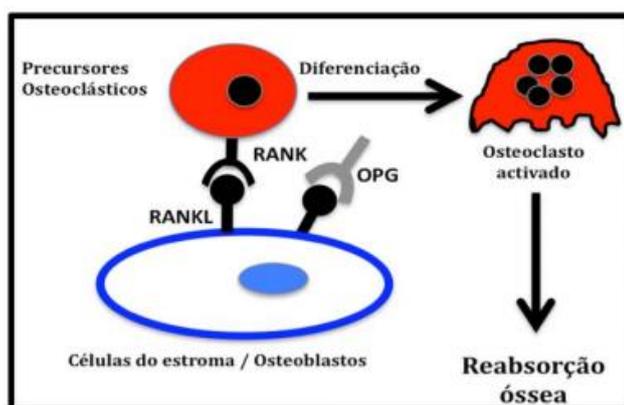


Figura 6 – Esquema do processo de diferenciação dos osteoclastos por intervenção direta dos osteoblastos através do sistema RANKL/RANK/OPG (JUDAS, 2012)

Os pré-osteoblastos vão produzindo OPG, que ao ligar-se ao RANKL desativa os osteoclastos, finalizando a fase de reabsorção. Os osteoblastos diferenciados iniciam então a formação e mineralização de um novo tecido ósseo, completando assim o processo de remodelação óssea (JUDAS, 2012).

### 2.3 Reparo ósseo

O processo de reparo ósseo pode ocorrer por cicatrização ou por regeneração. O processo por regeneração é caracterizado pelo reparo que restabelece a forma e função original do tecido de maneira integral. Já na cicatrização o restabelecimento é parcial e o reparo ocorre por um tipo de tecido diferente do original. O tecido ósseo

geralmente sofre reparo por regeneração devido a sua capacidade de se regenerar (LIMA, 2013).

Quando lesado, o tecido passa por um processo que envolve três fases: fase inflamatória, fase reparadora e fase de remodelação. Na fase inflamatória ocorre a formação de um coágulo sanguíneo que envolve as superfícies ósseas no local da lesão, indo do periósteo até a cavidades medulares próximas. Na fase reparadora há o aparecimento de um grande número de fibroblastos produtores de colágeno tipo III responsáveis pela formação de um calo fibroso, no qual as fibras de colágeno envolvem a região lesionada. A fase de remodelação, como já foi dita anteriormente, caracteriza-se pela diferenciação celular e formação e mineralização de um novo osso (LIMA, 2013; WANTOWSKI, 2007).

A duração de cada fase depende do tipo de osso envolvido, idade do indivíduo, estado de saúde e nutricional, intensidade do trauma, se há ou não irrigação local, presença ou não de forças mecânicas, imobilização e ausência de infecção para que o tecido possa se reconstituir (TEN CATE, 2011).

Todavia, a capacidade de regeneração pode não se manifestar em defeitos ósseos de grandes dimensões, uma vez que para haver cicatrização no processo de reparo é fundamental a existência de uma continuidade óssea no local (LIMA, 2013). Neste caso o tecido ósseo não exige regeneração espontânea, exigindo procedimentos reconstrutivos como por exemplo o enxerto ósseo.

## **2.4 Enxerto ósseo**

Os ossos se desenvolvem, remodelam e desempenham diversas funções estruturais, entre elas a de suporte do corpo e proteção dos órgãos internos e também funcionam como alavanca para os movimentos musculares (SHIMANO, 2006).

Os tecidos ósseos são especializados, vascularizados e dinâmicos, que se modificam ao longo da vida do organismo (FAVERANI, 2014). Uma das características desse tecido é sua capacidade regenerativa, porém essa propriedade pode tornar-se limitada se o tamanho do defeito for grande, não sendo possível uma regeneração total do tecido (LUTOLF et al, 2013). Diante deste problema, estratégias são utilizadas para restaurar o tecido biológico afim de manter suas funções, entre elas a utilização de materiais naturais ou sintéticos que possam substituir tecidos perdidos moles ou duros (FAVERANI, 2014).

Os enxertos são amplamente usados na medicina (cirurgias plásticas e ortopédicas) e odontologia (reconstrução maxilo-mandibulares), favorecendo o processo de reparo ósseo pelo preenchimento do defeito e levando a formação de um novo osso por meio de três mecanismos biológicos: osteogênese, osteoindução e osteocondução, (LIMA, 2013).

A osteogênese ocorre quando células vivas do próprio enxerto permanecem com capacidade de formação de um novo tecido no leito receptor. Osteoindução é a propriedade de formação de um novo osso pelas células do leito receptor. Já a osteocondução é a propriedade de produção de um novo osso por proliferação e migração de celular ósseas no leito receptor através da superfície do enxerto (LIMA, 2013).

Um material, natural ou sintético, para enxertos deve ser biocompatível e promover osteoindução e osteocondução, favorecendo assim a formação de um novo tecido ósseo firme e saudável.

Os enxertos ósseos podem ser classificados quanto a sua natureza como autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos (BELLON, 2012).

Os enxertos autógenos são aqueles retirados do próprio paciente de uma área doadora e transferidos para uma área receptora. Além da sua capacidade osteogênica e osteoindutora, desencadeiam uma boa resposta imune do organismo, sendo considerados a melhor opção (FAVERANI, 2014).

Os enxertos alógenos são retirados de um outro indivíduo da mesma espécie do receptor, são realizados em condições de esterilidade e podem ser armazenados em bancos de ossos humanos. Possuem característica osteocondutoras, por fornecerem estrutura para a migração da célula, e osteoindutoras, por possuírem proteínas denominadas morfogenéticas do osso e que são preservadas mesmo após o congelamento (FAVERANI, 2014).

Já os enxertos exógenos são retirados de um indivíduo de espécie diferente do receptor, sendo os mais comuns os obtidos de bovinos, são produzidos a partir da porção inorgânica do animal.

Por fim, os enxertos aloplásticos tem sua origem completamente sintética, como as biocerâmicas. Surgiram da dificuldade de se usar enxertos autógenos, limitação da quantidade de enxerto e pela possibilidade de transmissão de doenças.

Apesar dos enxertos autógenos serem considerados a melhor opção quando

comparados com enxertos exógenos e aloplásticos, os aloplásticos têm sido muito utilizados devido a sua disponibilidade e por dispensarem um doador. Entre os materiais sintéticos para enxerto ósseo podem ser citados o polietileno poroso, tipo de material biocompatível de várias formas e tamanhos; telas de titânio, material mais utilizado devido a sua facilidade de adaptação, mas que propiciam grandes riscos de infecções; a hidroxiapatita, material de mínimos danos inflamatórios; e os biovidros, material compatível biologicamente e que permite o crescimento e divisão de células além de ser um material osteocondutivo, favorecendo o crescimento de tecido ósseo em sua superfície (FAEDINI, 2010)

Os materiais para enxerto podem ser classificados como osteogênicos, osteoindutores ou osteocondutores. Os materiais osteogênicos são aqueles capazes de estimular a formação do osso a partir do osteoblasto. Os materiais osteoindutores são capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos ou condroblastos, aumentando a formação óssea no local ou estimulando a formação de um novo osso. Os materiais osteocondutores são geralmente inorgânicos e permitem a formação de um novo tecido em sua superfície, necessitando de uma fonte de células osteogênitoras (PUCCI, 2003). Além disso, o material para enxerto ideal deve:

- 1) ser fornecido de forma ilimitada, mas sem comprometer a área doadora;
- 2) promover osteogênese;
- 3) não apresentar resposta imunológica do hospedeiro;
- 4) revascularização rápida;
- 5) estimular a osteoindução;
- 6) promover osteocondução;
- 7) ser substituído completamente por isso em quantidade e qualidade semelhante a do hospedeiro (PUCCI, 2003).

Uma das aplicações mais importantes da enxertia óssea é na área da odontologia, onde pode haver a necessidade de correção de pequenos ou grandes defeitos ósseos para a colocação de implantes.

## 2.5 Biovidros

Biovidros são materiais promissores por apresentarem boa biocompatibilidade, promoverem união química ao osso natural e apresentarem propriedades osteocondutivas (BELLON, 2012).

Desenvolvido por Larry L. Hench em 1967, em novembro de 1969 foi sintetizado o primeiro biovidro chamado de 45S5 em referência à sua composição em porcentagens de peso por 45% de SiO<sub>2</sub>, 24,5% de CaO, 24,5% de Na<sub>2</sub>O e 6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (HENCH, 2006), esta proporção de cálcio e fósforo promove a formação de apatita entre a prótese e o tecido, promovendo uma ligação química rápida e durável (BELLON, 2012). Os primeiros implantes foram realizados em fêmures de ratos por Ted Greenlee, e após seis semanas foi constatado que os implantes não saíram do osso. Com esta experiência bem sucedida, foi publicado o primeiro artigo com testes *in vivo* e *in vitro* (HENCH, 2006).

Os testes *in vitro* mostraram a formação de cristais de hidroxiapatita, que possui a mesma composição química e estrutura cristalina dos ossos (COSTA, 2004), formando uma forte ligação química com as fibras de colágeno produzidas pelos osteoblastos (HENCH, 2006). O primeiro uso cirúrgico em humanos foi para substituir ossículos do ouvido como tratamento de perda auditiva, a interface entre o implante e o osso é próximo do que ocorre naturalmente entre ossos, tendões e ligamentos (BELLON, 2012).

Devido a sua característica de produzir HAp e que interage diretamente com o tecido vivo, favorecendo a formação de um novo tecido, os biovidros podem ser considerados como bioativos, ou seja, têm capacidade de formar uma ligação interfacial forte com o tecido vivo adjacente, mas o tempo e mecanismo para que essa ligação ocorra e as propriedades dessa camada formada dependem de cada material (HENCH, 1991). A ligação interfacial ocorre pela formação de HAp que cresce como um aglomerado policristalino onde fibrilas de colágeno são incorporadas, ligando a superfície do implante aos constituintes do tecido (HENCH e WILSON, 1993). Hench definiu a bioatividade dos biovidros como “um material que retorna respostas específicas na sua interface, resultando na formação de uma ligação entre os tecidos e o material”.

Os materiais bioativos usados para a reposição ou regeneração de tecidos devem possuir uma cinética de liberação química controlada que seja sincronizada com a sequência de alterações celulares que ocorrerão no reparo do tecido. Se as taxas de dissolução forem muito rápidas as concentrações iônicas serão muito altas para serem efetivas e se as taxas forem muito lentas as concentrações serão muito baixas para ocorrer proliferação e diferenciação celular (HENCH, 2006). Diante das diferenças nas taxas de regeneração óssea *in vivo* e extensão do reparo ósseo, Hench e Wilson propuseram duas classes de bioatividade, sendo elas: Osteoindutoras (Classe A) e Osteocondutoras (Classe B) (HENCH e WILSON, 1993). Os materiais osteoindutores são aqueles que aderem ao tecido duro e mole e apresentam elevados índices de bioatividade,  $I_B=1-13$ , nesta classe encontramos o *Bioglass*<sup>®</sup> 45S5, que possui  $I_B=12$  (BELLON, 2012; COELHO, 2016; GUASTALDI, 2010). Uma das características mais importantes de um material bioativo de Classe A é que ele melhora a proliferação e a diferenciação de células progenitoras, ou seja, ele estimula a diferenciação em osteoblastos (osteoindução) e possibilita a proliferação do tecido na superfície devido ao aumento da atividade destes osteoblastos como consequências de reações rápidas na superfície do vidro bioativo (BELLON, 2012 e HENCH, 1996). A bioatividade de Classe B ocorre quando há apenas a presença de osteocondução, isto é, o implante providencia uma interface biocompatível, sobre o qual células responsáveis pela produção de tecido conseguem aderir, crescer e atravessar todo o material (ostecondução). Os materiais osteocondutores aderem somente ao osso e apresentam índices de bioatividade menores  $I_B=3-60$ , ou seja, tem baixa ou nenhuma troca de íons. São exemplos desses materiais A-W *Cerabone*<sup>®</sup> e HAp, com  $I_B=6$  e 3,1, respectivamente (GUASTALDI, 2010).

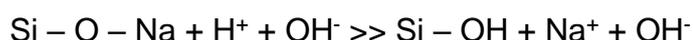
A bioatividade do material pode ser verificada por testes *in vitro*, onde o material é imerso em soluções que simulam os fluidos corpóreos. A solução mais usada atualmente é a desenvolvida por Kokudo e Takadama, 2006, SBF-K9, uma solução aquosa acelular e aprroteica com concentrações iônicas próximas a do plasma sanguíneo (BELLON, 2012).

A formação de HAp na superfície do biovidro ocorre através de reações químicas, que serão mais rápidas ou mais lentas de acordo com a bioatividade do material. O tempo de imersão do material que será testado na solução pode variar de

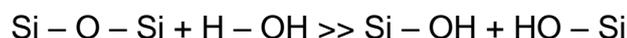
3 horas a 15 dias, dependendo também do seu índice de bioatividade (BELLON, 2012; SIQUEIRA e ZANOTTO, 2011).

Essas reações estão representadas na Figura 7 e têm seus estágios resumidos abaixo por Siqueira e Zanotto:

ESTÁGIO 1: troca rápida de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  do material com íon  $\text{H}^+$  da solução, aumentando o pH do meio:



ESTÁGIO 2: liberação de sílica solúvel do material para a solução na forma de  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , resultado da quebra de ligação siloxano ( $\text{Si-O-Si}$ ) e contínua formação de grupos silanol:



ESTÁGIO 3: policondensação dos grupos silanol formando uma camada porosa rica em sílica na superfície do material exaurida de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^+$ :



ESTÁGIO 4: com o passar do tempo há maior concentração de íons na solução, favorecendo a formação de um filme amorfo rico em  $\text{Ca}^+$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  na superfície do material quando o ponto de saturação da solução é alcançado.

ESTÁGIO 5: formação da HAp na superfície do material em consequência da cristalização do filme amorfo pela incorporação de íons  $\text{OH}^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$  presente na solução.

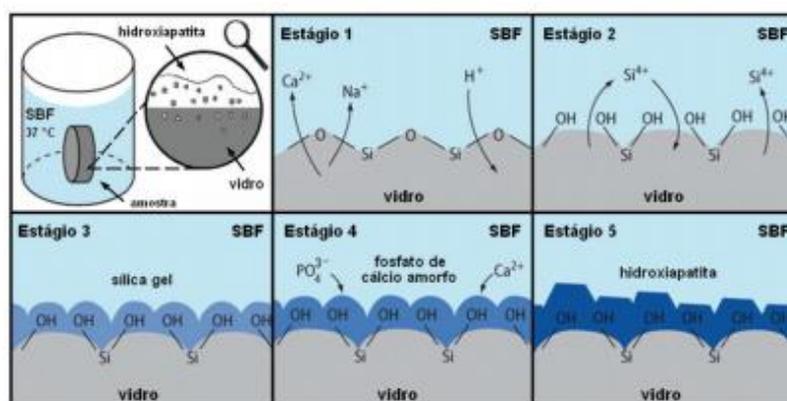


Figura 7 – Representação do mecanismo de formação de HAp na superfície de um biovidro (SIQUEIRA e ZANOTTO, 2011)

Além desses cinco estágios, Hench afirma ter mais cinco etapas:

ETAPA 1: A adsorção de proteínas específicas na camada SiO<sub>2</sub>-HAp;

ETAPA 2: Ação de macrófagos;

ETAPA 3: Adesão e diferenciação celular;

ETAPA 4: Formação de matriz celular;

ETAPA 5: Mineralização da matriz.

Os cinco primeiros estágios são mais rápidos e não dependem da presença de tecidos, apenas da composição dos vidros. As cinco etapas seguintes são reações de interação com o tecido (COÊLHO, 2016).

Biovidros da Classe A tem sua adesão permitida pela liberação de silício na formação de ácido silícico devido a troca de íons e dissolução, processo que resulta na formação de uma camada de sílica-gel e acelera a precipitação de fosfato de cálcio amorfo que ao cristalizar forma a HAp (1 – 10 horas em SBF – K9). Já os biovidros de Classe B como têm baixa só formam HAp acima de 100 horas em solução SBF (Simulator body fluid) (HENCH, 1994).

Há biovidros de diferentes concentrações e composições, sendo eles:

I - 45S5: 45 mol% SiO<sub>2</sub>; 24,5 mol% CaO; 24,5 mol% Na<sub>2</sub>O; 6.0 mol% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>;

II - 58S: 60 mol% SiO<sub>2</sub>; 36 mol% CaO; 4 mol% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>;

III - 70S30C: 70 mol% SiO<sub>2</sub>; 30 mol% CaO;

IV - S53P4: 53 mol% SiO<sub>2</sub>; 23 mol% Na<sub>2</sub>O; 20 mol% CaO; 4 mol% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>;

que podem ser obtidos de três formas:

- 1) Síntese de resfriamento em fusão: método usado originalmente por Hench onde os óxidos são derretidos em um cadinho de platina para evitar contaminação, em temperaturas na faixa de 1100-1300°C. Os materiais produzidos por esta técnica são menos porosos e podem gerar defeitos na integração do tecido (DELIORMANH, 2006 e SEPULVEDA, 2001).
- 2) Síntese de Sol-Gel: realizada em temperaturas mais baixas, envolve a criação de uma solução composta por precursores metálicos e orgânicos de

sal. Um gel é formado através de reações de hidrólise e condensação e então é seco e estabilizado termicamente em temperaturas que variam de 600-800°C. Há um maior controle no nível de composição e resultado final do material (DELIORMANH, 2006 e SEPULVEDA, 2001).

- 3) Síntese de micro-ondas: método rápido e de baixo custo no qual os precursores são dissolvidos em água deionizada e transferidos para um banho ultrassônico. O pó amorfo obtido é lavado, filtrado e seco durante 24 horas a 80°C, após, são calcinados a temperaturas de 700°C para o desenvolvimento do biovidro (SARKAR, 2011).

O *Bioglass*® 45S5 foi a primeira composição popular e a mais favorável. Inicialmente acreditava-se que  $P_2O_4$  era necessário para manter a bioatividade do material, mas depois constatou-se que este ajuda a produzir a fase de fosfato de cálcio na superfície. (SIQUEIRA e ZANOTTO, 2011)

Apesar de sua boa bioatividade, os biovidros são materiais de baixa resistência mecânica e baixa tenacidade à fratura, reduzindo a possibilidade de sua aplicação em situações estruturais e limitando o seu uso na forma de partículas ou granulados (COELHO, 2016). Entretanto, suas aplicações são inúmeras, entre elas a sua utilização como reconstrutor ósseo, utilização em cirurgias orais para preenchimento de alvéolo dentário, em periodontia para a reconstrução de defeitos ósseos verticais ou mesmo para recobrimento de implantes, o que aumenta a osteointegração deste ao osso (PAIVA, 2005).

### **3. Objetivos**

O desenvolvimento desse trabalho visou contribuir para os estudos relacionados ao biovidro ativo comercial *BioGran*<sup>®</sup>, tendo em vista sua importância enquanto material para enxerto ósseo e suas diversas possibilidades de aplicação. Assim, os objetivos específicos deste trabalho foram: desenvolver um biomaterial híbrido à base de vidro bioativo e cloridrato de raloxifeno, por meio do método sonoquímico, considerando-se um tempo ideal de sonicação na preparação. Em seguida, combinar o vidro bioativo com diferentes concentrações de raloxifeno afim de avaliar o potencial tópico do fármaco na regeneração óssea em defeitos ósseos criados em ratos.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Sonoquímica

O método sonoquímico consiste na síntese assistida por ultrassom, que permite grande variedade de materiais nanoestruturados a partir de ondas ultrassônicas em meio líquido, que causam transformações químicas e físicas na amostra devido à interação da radiação com a matéria (BANG, 2010; MARTINEZ, 1999).

O resultado final da síntese sonoquímica dependerá da frequência escolhida uma vez que sua magnitude é inversamente proporcional a potência de saída. Assim, dois tipos de ultrassom são considerados:

- 1) o de baixa intensidade e alta frequência (na faixa dos MHz), onde o estado do meio não é alterado. Pode ser empregado em avaliações não destrutivas e diagnósticos médicos.
- 2) o de alta intensidade e baixa frequência (na faixa dos kHz), onde há modificação do estado do meio, podendo ser usado em aplicações sonoquímicas em que a irradiação do ultrassom provoca alteração química do meio (ALMEIDA, 2013).

Na sonoquímica, os efeitos surgem a partir do fenômeno de cavitação acústica, ou seja, a formação, crescimento e colapso implosivo de bolhas em líquidos com tempo de vida na ordem de microssegundos (BANG, 2010 e ALMEIDA, 2013).

As bolhas são criadas a partir de ciclos periódicos de compressão e expansão durante a propagação da onda, fazendo com que a bolha cresça até determinado tamanho e imploda em seguida. Durante a implosão uma grande quantidade de energia é liberada, favorecendo as condições para a transformação da matéria devido a produção de elevadas temperaturas e pressões, 5000 K e 1000 atm. respectivamente. O tamanho da bolha de cavitação depende da densidade do líquido, frequência aplicada, pressão hidrodinâmica e da pressão acústica (ALMEIDA, 2013).

O processador ultrassônico usado neste trabalho é da marca Sonics, modelo VCX-750, com uma potência de 750 Watts e frequência de 20 kHz. A preparação da amostra foi realizada em temperatura ambiente segundo a montagem ilustrada abaixo (Figura 8).



Figura 8 – Representação esquemática da montagem do equipamento Sonics VCX-750 para síntese da amostra (COSTA, 2014)

#### 4.1.1 Síntese do biovidro

Antes de obter o material híbrido à base de biovidro/raloxifeno, uma investigação foi conduzida para se avaliar o efeito do tempo de sonicação do Biogran® puro sobre parâmetros referentes à remodelação óssea. Para tal, amostras de 1 g de BioGran foram processadas com um processador ultrassônico (Sonics® VCX-750, Sonics & Materials, Inc., EUA) por diferentes tempos de processamento/sonicação: 15, 30, 45 ou 90 min. Os parâmetros de sonicação foram definidos da seguinte forma: potência de 750 W; frequência de 20 kHz; amplitude fixada a 40% da amplitude nominal. Utilizou-se água ultrapura como meio para obter sistemas homogêneos e diminuir o tamanho das partículas. Após o processamento, as amostras foram deixadas em estufa a 80°C para secar. A Tabela 1 mostra os grupos criados nessa etapa.

Tabela 1 – Grupos de amostras preparadas para estudo do efeito do tempo de sonicação.

Material	Tempo de sonicação
BioGran® puro	15 min
	30 min
	45 min
	90 min

Após o estudo dos resultados dos diferentes tempos de sonicação, outra investigação foi conduzida sobre a associação entre biovidro e raloxifeno. Amostras de Biogran® foram misturadas com diferentes quantidades de raloxifeno (Tabela 2) e submetidas a processamento ultrassônico em água ultrapura durante 15 min. Os parâmetros de sonicação foram iguais aos descritos anteriormente.

Tabela 2 – Grupos experimentais com diferentes concentrações de raloxifeno.

<b>Grupo</b>	<b>Descrição</b>
<b>RAL0</b>	0% de raloxifeno, 100% de BioGran; grupo controle
<b>RAL5</b>	5% de raloxifeno, 95% de BioGran
<b>RAL10</b>	10% de raloxifeno, 90% de BioGran
<b>RAL20</b>	20% de raloxifeno, 80% de BioGran
<b>RAL30</b>	30% de raloxifeno, 70% de BioGran

Amostras com 5% e 30% de raloxifeno foram descartadas por não preencherem totalmente o defeito ósseo realizado na calvária dos animais.

#### **4.2 Testes *in vivo***

Os testes *in vivo* foram realizados na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo doutorando Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roberta Okamoto.

Um total de trinta e cinco ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos adultos, pesando entre 200 e 300 g, foi utilizado após a aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba (processos nº 00199-2017 e 00235-2017).

Estes animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum* no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba – Unesp.

#### 4.2.1 Cirurgias Experimentais

Dois modelos de defeitos ósseos foram implementados nesse estudo: na tíbia do rato (modelo 1) ou na calvária (modelo 2).

No Modelo 1, vinte ratos foram distribuídos em quatro grupos (n=5) correspondentes aos tempos de sonicação do BioGran: 15, 30, 45 e 90 min. Os animais foram preparados para cirurgia e anestesiados com injeção intramuscular de uma mistura de cloridrato de ketamina ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e xilazina ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Cada rato teve a perna raspada e a antisepsia foi realizada com polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I). Uma incisão completa foi feita sobre a metáfise tibial (Figura 9a) para expor a superfície óssea. Usando uma sequência de brocas sob irrigação salina (solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%), um defeito de 3 mm de diâmetro foi perfurado da cortical para o osso medular (Figura 9b). Um implante dentário (titânio comercial puro de grau IV; superfícies condicionadas com ácido; diâmetro de 2 mm; comprimento de 5 mm) foi inserido no defeito tibial (Figura 9c). O espaço livre entre a parede lateral do defeito e a superfície externa do implante foi completamente preenchido com o biomaterial correspondente, seguido de sutura e fechamento da ferida (Figura 9d). Os implantes foram esterilizados com radiação gama antecipadamente.

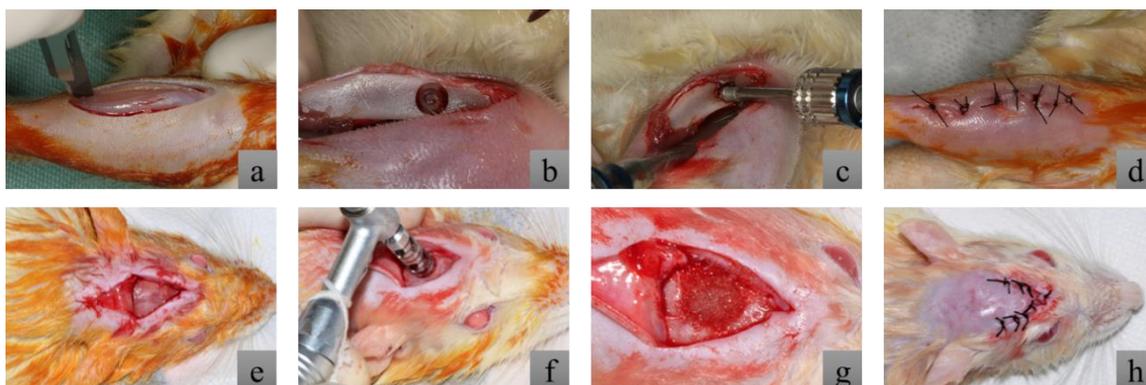


Figura 9 – Cirurgia nos ratos no Modelo 1 (a-d) e Modelo 2 (e-h)

No Modelo 2, outros quinze ratos foram divididos em grupos (n=5) de acordo com a porcentagem em massa de raloxifeno nas misturas de biovidro: RAL0 (0% raloxifeno, 100% BioGran; grupo controle); RAL10 (10% de raloxifeno, 90% de BioGran); RAL20 (20% de raloxifeno, 80% de BioGran). Tricotomia e procedimentos

assépticos de rotina foram realizados. Uma incisão em forma de U foi feita para expor os ossos parietais (Figura 9e). Usando uma broca trefina de aço inoxidável sob irrigação salina constante, um defeito de 5 mm de diâmetro foi criado nos ossos parietais (Figura 9f), enquanto cuidados substanciais foram tomados para manter a integridade da dura-máter. O defeito crítico foi preenchido com biomaterial (de acordo com o grupo correspondente) (Figura 9g) e coberto com uma membrana de colágeno do osso cortical bovino. A incisão periosteal e a pele foram então suturadas (Figura 9h).

No pós-operatório imediato, cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

Os animais foram eutanasiados após sessenta dias (modelo 1) e trinta dias (modelo 2) da cirurgia por meio de uma dose excessiva de tiopental sódico (100 mg Kg<sup>-1</sup>, via intraperitoneal).

### **4.3 Técnicas de caracterização**

#### **4.3.1 Difração de raios X**

A difração de raios X é utilizada para determinar estrutura cristalográfica, uma vez que os planos de difração e suas distâncias interplanares são características específicas e únicas de cada sistema de ordenação (TRINO, 2014 e CALLISTER).

Os raios X são uma forma de radiação eletromagnética que possuem altas energias e comprimentos de onda curtos. A amostra é bombardeada por raios X para produzir um padrão de difração que é coletado com a ajuda de um detector, os átomos no cristal funcionam como centros de espalhamento. Quando o feixe incide sobre um conjunto de planos cristalinos de distância interplanar  $d$ , os feixes refletidos sofrerão difração. O feixe de raios X será observado se houver uma superposição construtiva, ou seja, se a diferença do comprimento de onda entre os caminhos ópticos for um número inteiro, do contrário haverá superposição destrutiva e não será possível observar sinal de raios X.

A condição para interferência construtiva é determinada pela lei de Bragg:

$$n \lambda = 2 d \sin \theta$$

onde  $\theta$  é o ângulo de incidência,  $\lambda$  é o comprimento de ondas dos raios X, e  $n$  é a ordem de difração. Assim, sabendo o ângulo e o comprimento de onda ( $\lambda=0,154059$  nm para a linha  $K\alpha$  do cobre), a distância interplanar e a estrutura cristalina podem ser determinadas.

Como cada material tem um conjunto específico de planos com diferentes distâncias interplanares, os picos dos planos podem ser obtidos através de uma varredura da intensidade pelo ângulo de difração ( $2\theta$ ), podendo assim identificar o material estudado. A Figura 10 representa o diagrama esquemático de uma difratômetro de raios X e a Figura 11 mostra o padrão de difração para uma amostra de chumbo.

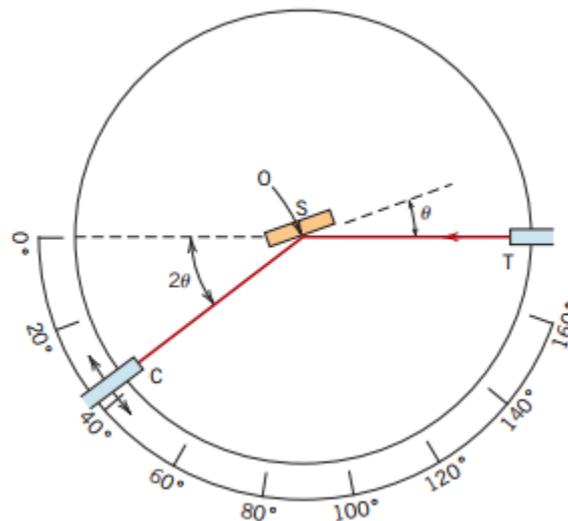


Figura 10 – Diagrama esquemático de um difratômetro de raios X onde T representa a fonte de raios X, S a amostra, C o detector e O o eixo ao redor do qual giram a amostra e o detector (CALLISTER).

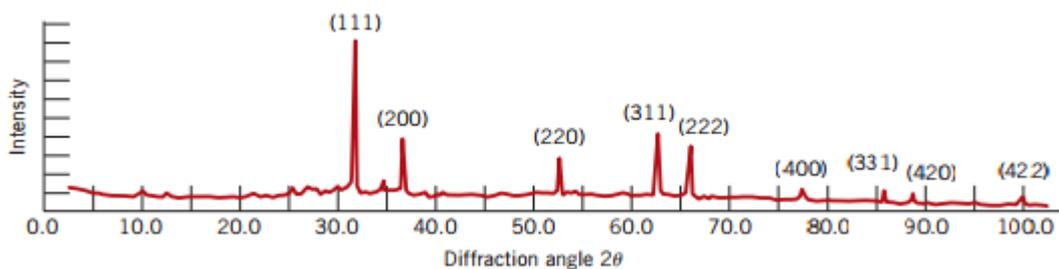


Figura 11 – Padrão de difração para uma amostra de chumbo (CALLISTER).

Em um difratômetro tradicional, um arranjo geométrico conhecido como geometria Bragg-Brentano (Figura 12) possibilita a obtenção do ângulo  $2\theta$  a partir da captação do eixo difratado feita por meio de um detector.

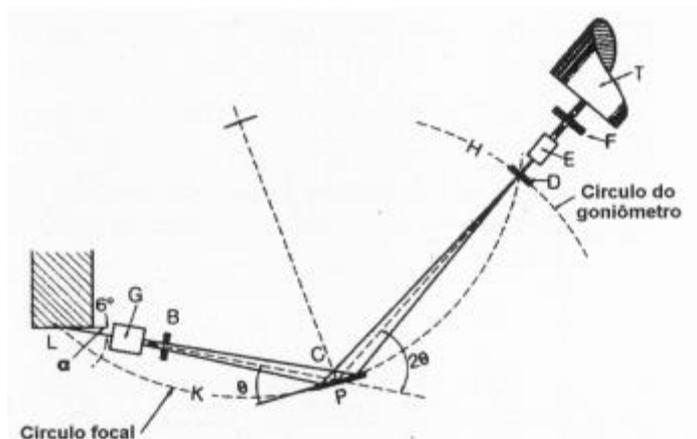


Figura 12 – Geometria parafocal Bragg-Brentano (JENKINS, 1989)

O feixe difratado é expresso através de picos que se destacam do *background* e são registrados em um espectro de intensidade versus o ângulo  $2\theta$ , constituindo o difratograma (CULLITY e ROCK).

As intensidades obtidas em ângulos  $2\theta$ , representadas por picos no difratograma, correspondem à difração do feixe incidente por um determinado conjunto de planos do cristal, que possuem mesma distância interplanar, cada qual com índices de Miller  $hkl$ . No método do pó, cada partícula da amostra se comportará como um pequeno cristal, com orientação aleatória em relação ao feixe de raios X incidente. A identificação das substâncias cristalinas é obtida através da comparação do difratograma com padrões de fases individuais disponibilizados pelo ICDD (International Center for Diffraction Data, disponível em: <<http://www.icdd.com/>>). Acesso em 12 de agosto de 2017.

As medidas de difração de raios X foram realizadas em temperatura ambiente em um difratômetro Rigaku, MiniFlex600, da UNESP de Bauru, com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=0,154056$  nm) e filtro de Ni para eliminação da radiação  $\text{K}\beta$ . Foram utilizadas fendas DS 1,25°, SS 1,25°, e RS 0,3 mm, com corrente de 15 mA e um potencial de 40 KV. A varredura do detector foi feita de 10 a 100° com velocidade de 4°/min e passo de 0,04°.

### **4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Quando comparada com a microscopia óptica clássica, a microscopia eletrônica de varredura apresenta maior resolução da superfície sólida e morfologia topográfica do material (TRINO, 2014). Assim, a utilização da microscopia eletrônica é a melhor opção, possibilitando também a análise química do material.

A obtenção das imagens pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) ocorre pelo espalhamento de um fino feixe de elétrons de alta energia que é irradiado na amostra por um canhão de elétrons e passa através de uma série de lentes magnéticas. Conforme o feixe de elétrons primário vai varrendo a superfície do material, vai produzindo elétrons secundários e retroespalhados, que são coletados para fornecerem um sinal elétrico (TRINO, 2014). Os elétrons secundários fornecem a topografia da amostra em uma imagem de alta resolução, enquanto os retroespalhados fornecem uma imagem característica da variação da composição, chamado de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS).

As resoluções das imagens feitas pelo MEV são determinadas pelo diâmetro do feixe de elétrons, quanto menor o feixe, maior será a resolução alcançada. Além disso, a amplificação da imagem pode ser controlada variando a distância que o feixe está varrendo a amostra.

As imagens deste trabalho foram obtidas por um microscópio eletrônico ZEISS LS 15, na UNESP de Bauru. As amostras foram preparadas colando um substrato de cada subgrupo em fitas de carbono sobre um porta amostra (*stub*) e metalizadas com ouro por 120 segundos.

### **4.3.3 Micro CT**

As medidas de micro CT foram realizadas na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo doutorando Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roberta Okamoto.

Para analisar a neoformação óssea nos defeitos da tíbia e calvária, os defeitos ósseos foram removidos com o osso circundante, reduzidos e fixados em solução de formaldeído a 10% por 48 h. As amostras foram lavadas em água corrente por 24 h e armazenadas em etanol a 70% até serem retiradas para caracterizações.

A regeneração óssea nos defeitos tibiais foi avaliada por micro tomografia computadorizada (micro CT) com um scanner microtomográfico (SkyScan1172; Bruker, Bélgica). Utilizou-se um filtro de alumínio de 0,5 mm e as amostras foram rotacionadas ao longo de 360° com um passo de rotação de 0,6 °. A duração da varredura foi de aproximadamente 1 h e cada varredura produziu uma fatia de 6 µm de espessura a 90 kV e 111 µA. Os softwares integrados do scanner micro CT foram usados para processar os conjuntos de dados 3D e determinar a região de interesse (ROI), que incluiu uma região entre a terceira e quinta espira do implante na interface óssea (FAVERANI, 2018).

Cada ROI foi analisada com o software SkyScan CT-analyzer baseado em cem fatias. Os parâmetros obtidos a partir das imagens tridimensionais reconstruídas foram: porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp) e número de trabéculas (Tb.N).

O novo osso formado nos defeitos da calvária (tratado com *BioGran*® e raloxifeno) foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em conjunto com espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS).

## 5. Resultados e Discussões

Para este trabalho o biomaterial *BioGran*<sup>®</sup> foi escolhido por apresentar resultados satisfatórios quanto a suas propriedades osteocondutivas e por já ser utilizado como uma opção de enxerto ósseo na área da odontologia (BELLON, 2012). O raloxifeno por sua vez tem apresentado uma resposta favorável do tecido ósseo frente a condição de osteoporose e suas consequências. No osso, o raloxifeno aumenta a massa óssea e é eficaz em prevenir osteoporose em mulheres pós-menopausa (KAYATH, 1999). O método sonoquímico foi utilizado por se tratar de uma técnica viável economicamente e eficiente na redução e homogeneização das partículas na escala nanométrica devido a sua capacidade de fornecer alta temperatura e pressão em um curto intervalo de tempo, provocando uma rápida alteração morfológica (SANTOS, 2016).

Em geral os biovidros são amorfos, ou seja, não apresentam máximos de difração, porém quando em contato com fluidos biológicos tornam-se cristalinos devido a trocas iônicas (CRUZ, 2008), formando inicialmente cristais de apatita. A difratometria de raios X (Figura 13) do biovidro puro mostra que o material é predominantemente amorfo, porém é possível identificar pequenos picos em 23° e 31°, referentes a dióxido de silício e silicato de cálcio, respectivamente. Estes picos indicam que no processo de fabricação do material inicia-se um crescimento de cristais.

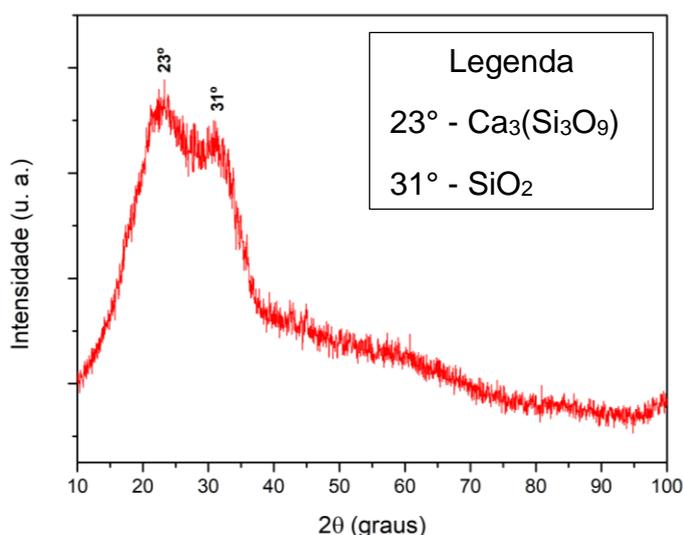


Figura 13 – Difratograma do *BioGran*<sup>®</sup>. Identificaram-se dois picos referentes a dióxido de silício - SiO<sub>2</sub> - (Ficha PCPDF 2-286) e silicato de cálcio - Ca<sub>3</sub>(Si<sub>3</sub>O<sub>9</sub>) - (Ficha PCPDF 72-1396).

Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura foi possível avaliar a morfologia do biovidro nos diferentes tempos de sonicação (Figura 14).

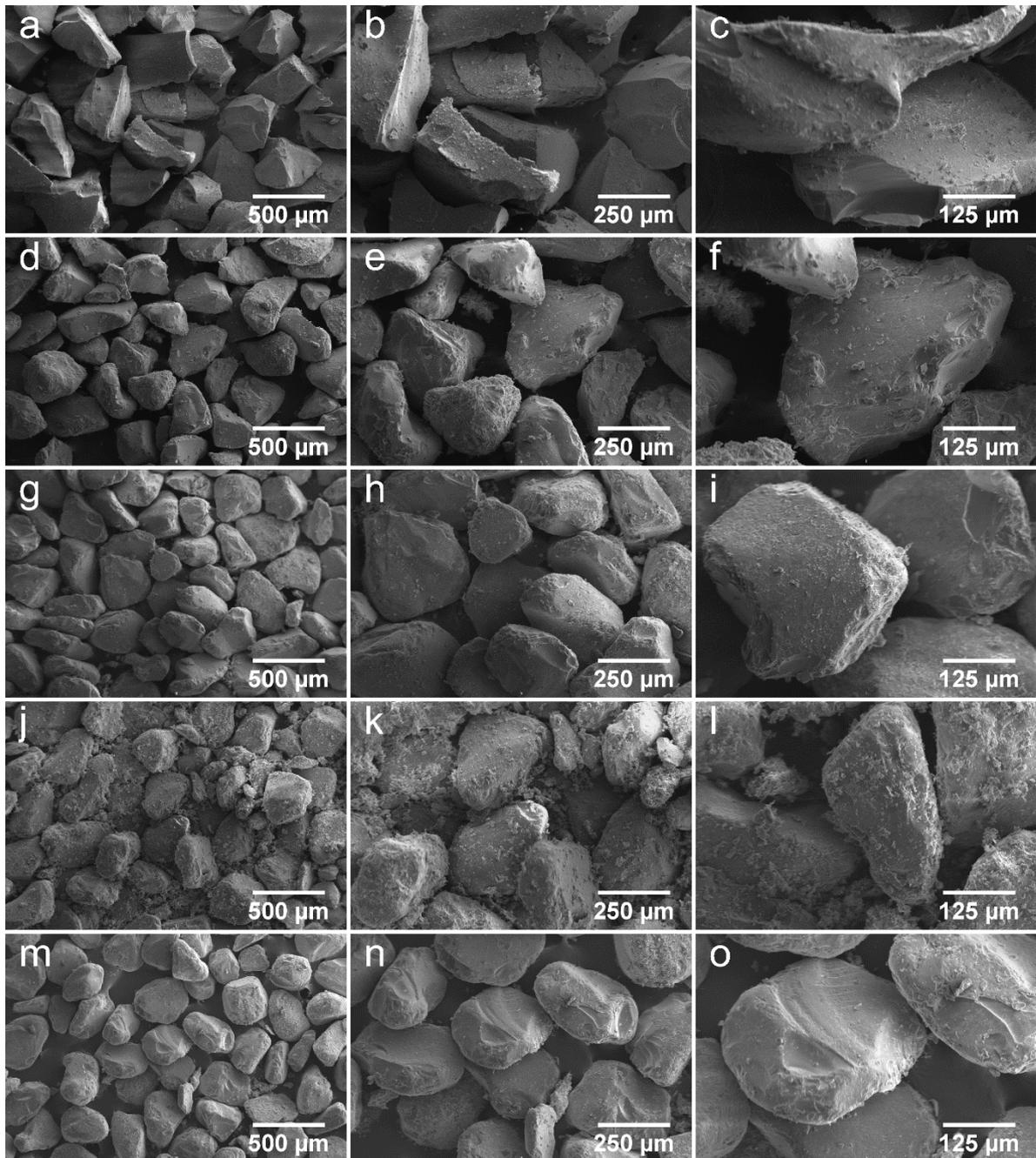


Figura 14 – Imagens de MEV do *BioGran*® puro sonicado para: (a-c) 0 min (controle); (d-f) 15 min; (g-i) 30 min; (j-l) 45 min; (m-o) 90 min. A ampliação aumenta da esquerda para a direita em cada sequência

Pode-se observar que não houve uma diferença significativa no tamanho dos grãos em diferentes tempos, as amostras processadas apresentaram bordas mais arredondas e tamanhos relativamente menores (Figuras 14d, 14g, 14j, 14m) em

comparação com partículas de BioGran que não foram sonicadas (Figura 14a). No entanto, o tamanho de partícula entre as amostras sonicadas permaneceu semelhante, independentemente do tempo de sonicação. De acordo com Franco e colaboradores, o tamanho das partículas pode ser controlado por diversas variáveis como a potência do equipamento, quantidade de amostra e tempo de sonicação, sendo que, quanto maior o tempo, menor o tamanho das partículas. A pouca alteração no tamanho do material processado pode estar relacionada com a potência utilizada, uma vez que quanto maior a potência menor ficam as partículas devido a maior intensidade do efeito de cavitação produzido pelo equipamento, fazendo com que as partículas de choquem com uma maior velocidade (CAMARGO, 2010). No entanto, o tamanho de partícula original da BioGran não deve ser reduzido consideravelmente, pois partículas de vidro que são muito pequenas podem limitar a reabsorção de sílica e ocasionar inflamação (WHEELER et al, 1998 e JONES, 2013). Visto que os tempos de sonicação foram variáveis, períodos mais longos de sonicação não afetaram o resultado do processo de reparo ósseo (Figura 15).

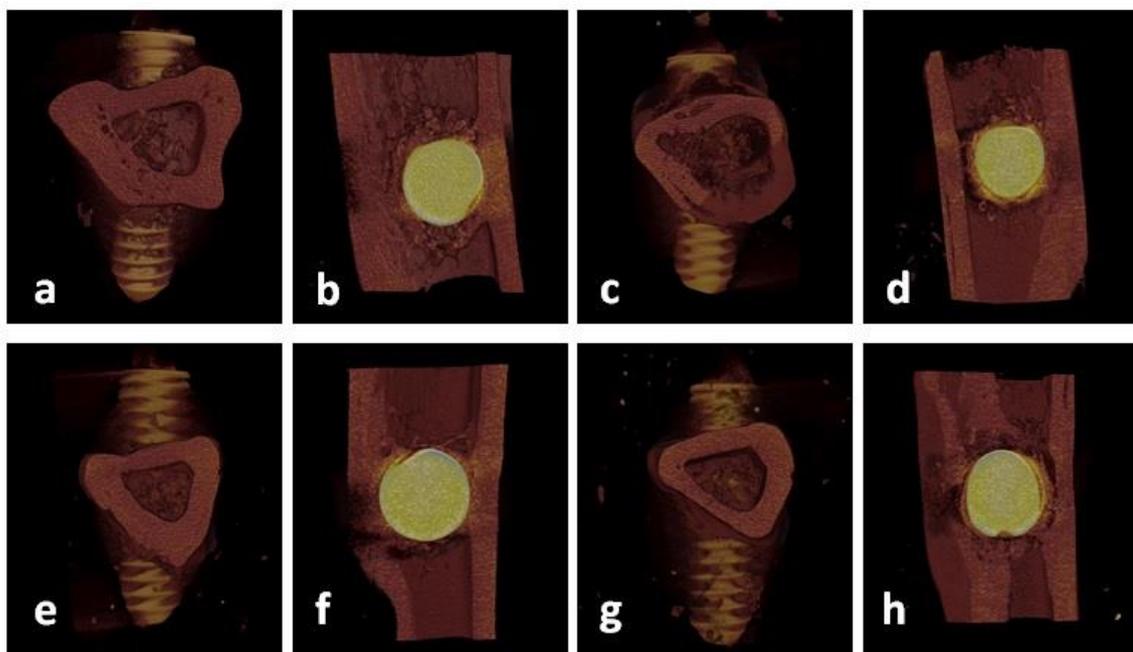


Figura 15 – Imagens de micro CT mostrando os defeitos perimplantares totalmente preenchidos após 30 dias dos grupos (a-b) 15 minutos; (c-d) 30 minutos; (e-f) 45 minutos e (f-g) 90 minutos.

Para a análise estatística dos dados de microCT, utilizou-se o teste estatístico ANOVA e nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes. A distribuição normal dos dados foi verificada com antecedência pelo teste de Shapiro-Wilk.

O grupo de 45 minutos foi o que apresentou os menores resultados com relação a porcentagem de volume ósseo (67,7%) (Figura 16a), espessura trabecular (0,083mm) (Figura 16b) e número de trabeculares (9,1 1/mm) (Figura 16d) e apresentou o maior resultado com relação a separação de trabéculas (0,041 mm) (Figura 16c). Já o tempo de 15 minutos foi o que apresentou os maiores resultados para porcentagem de volume ósseo (81,5%), espessura trabecular (0,086 mm) e separação das trabéculas (9,8 1/mm). Com relação a separação de trabéculas, os resultados de 30 minutos apresentaram o menor valor (0,027 mm). Os resultados de volume ósseo e separação das trabéculas e espessura trabecular dos tempos de 30 e 90 minutos ficaram intermediários entre os tempos de 15 e 45 minutos.

O efeito do tempo de sonicação do biovidro sobre parâmetros 3-D de morfologia óssea não foi significativo ( $p > 0,05$  em todos os parâmetros avaliados; Figura 16).

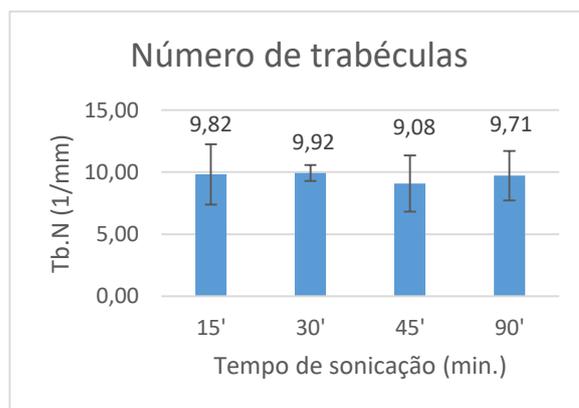
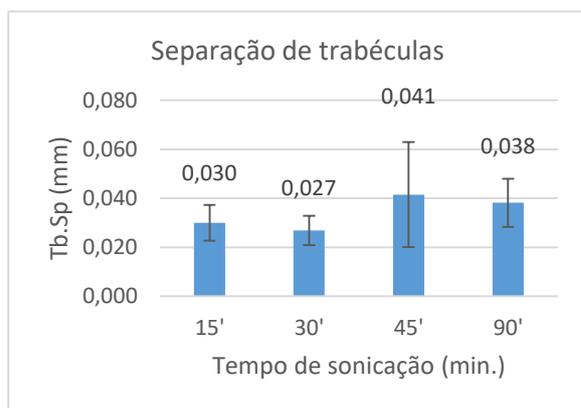
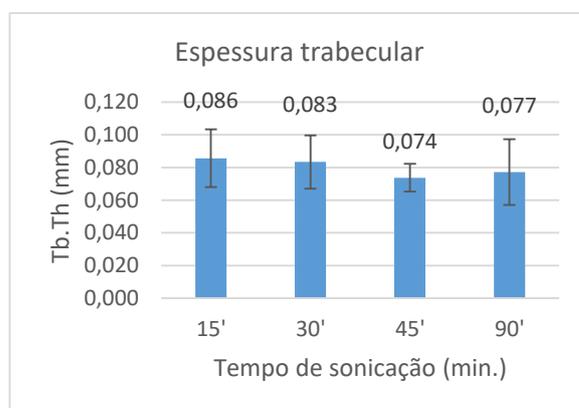
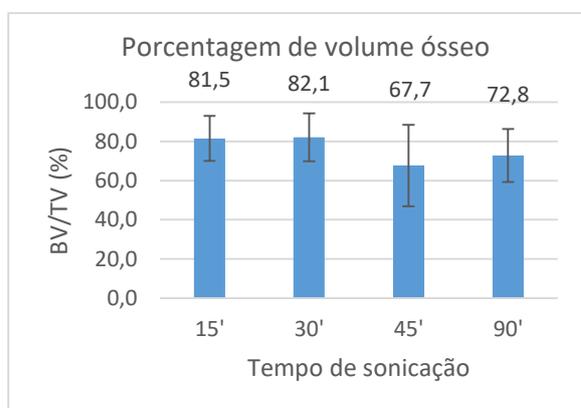


Figura 16 – Efeito do tempo de sonicação do *BioGran*® puro em diferentes parâmetros: (a) porcentagem de volume ósseo, (b) espessura trabecular, (c) separação de trabéculas e (d) número de trabéculas. No nível 0,05, as médias do grupo não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ , one-way ANOVA)

Diante disto, apesar dos resultados de 15 e 30 minutos não terem apresentados grandes diferenças, como as amostras não foram significativamente diferentes foi adotado o tempo de 15 minutos de sonicação para o estudo das diferentes concentrações de raloxifeno quando associados ao *BioGran*® por uma questão de otimização de tempo. Então foram realizados defeitos nas calvárias dos ratos afim de testar uma área maior e avaliar os benefícios do raloxifeno quando usado de forma tópica.

As imagens de micro CT para as diferentes concentrações de raloxifeno (Figura 17) mostram que nas amostras dos grupos CTR, RAL10 e RAL20 os defeitos foram totalmente preenchidos (LISBOA-FILHO etc al, 2018).

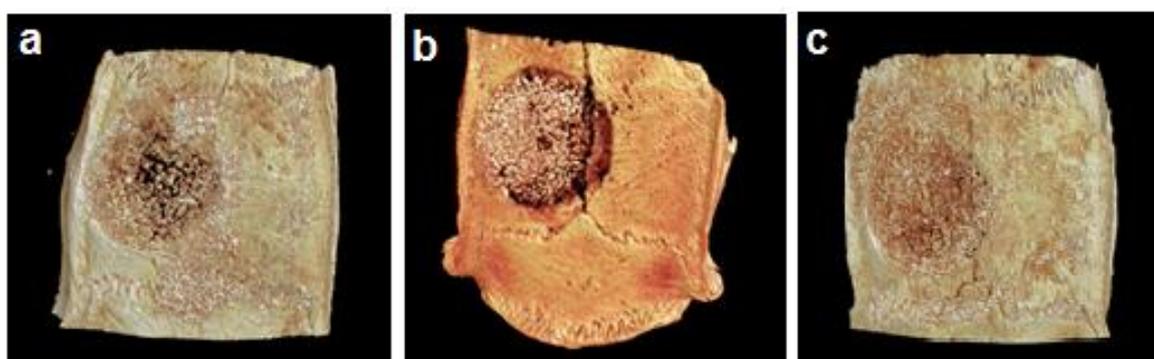


Figura 17 – Imagens de micro CT mostrando os defeitos totalmente preenchidos após 60 dias dos grupos (a) CTR (b) RAL10 e (c) RAL20

Já na análise estatística dos resultados do Modelo 2, é possível observar que o grupo RAL10 foi o que apresentou os menores resultados para a porcentagem de volume ósseo (10,05%) (Figura 18a) e para o números trabeculares (2,002 1/mm) (Figura 18d) e o maior resultado para separação de trabéculas (0,2746 mm) (Figura 18c). Enquanto os resultados do grupo RAL20 foram os que mais se aproximaram do grupo CTR (Figura 18) (LISBOA-FILHO etc al, 2018).

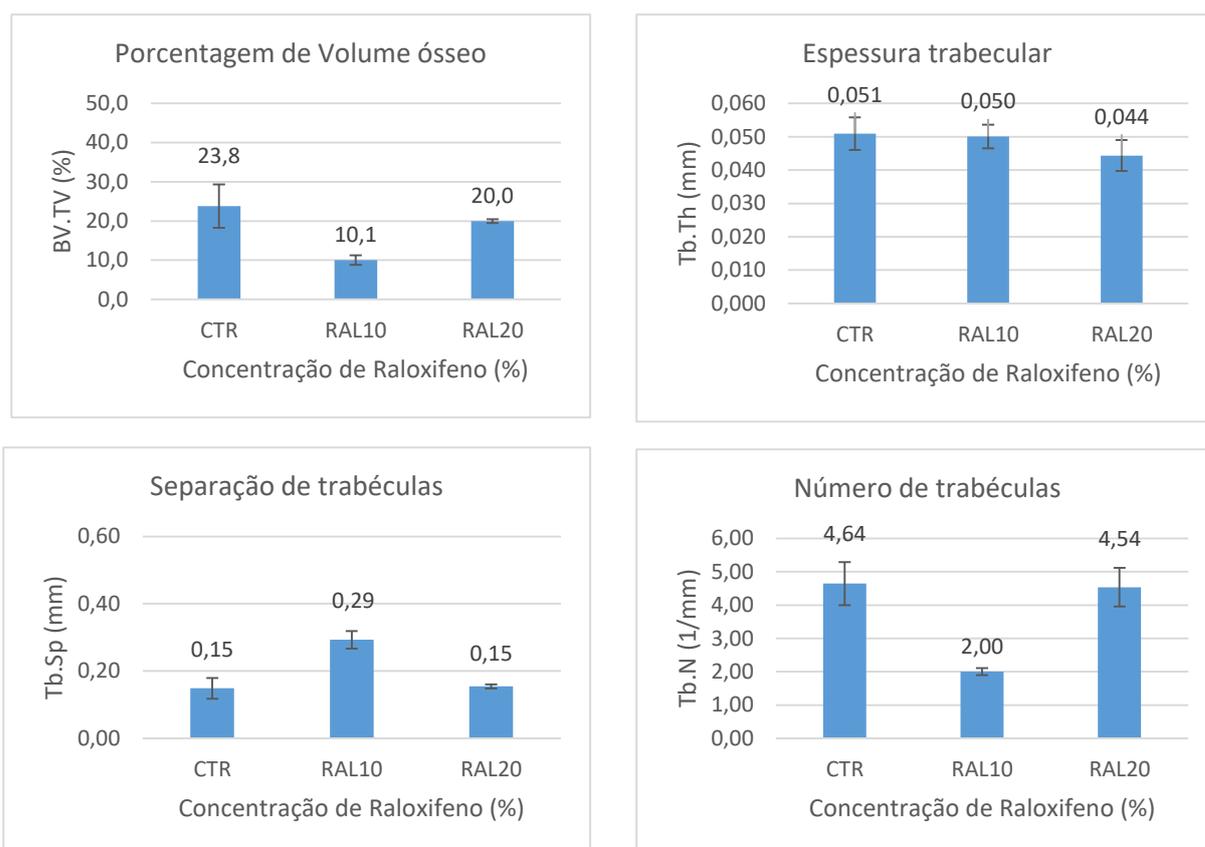


Figura 18 – Efeito da concentração de raloxifeno misturado com *BioGran*® sonificado por 15 minutos em diferentes parâmetros: (a) porcentagem de volume ósseo, (b) espessura trabecular, (c) separação de trabéculas e (d) número de trabéculas. No nível 0,05, as médias do grupo foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ , one-way ANOVA)

Os resultados de EDS obtidos para os defeitos da calvária tratados com *BioGran*® e raloxifeno são mostrados na Tabela 3, onde os resultados são a média aritmética a partir de dois pontos dentro do defeito (Figura19).

Tabela 3 – Distribuição dos elementos (%) no defeito do osso da calota e das calvárias tratadas com misturas de *BioGran*® e raloxifeno

Grupos	Composição (%)					
	C	O	P	Ca	Na	Si
<b>Osso original (sem defeito)</b>	1.86	60.62	13.80	23.72	-	-
<b>RAL0 (BioGran sem raloxifeno; controle)</b>	2.17	42.42	7.70	13.78	8.71	25.12
<b>RAL 10</b>	2.10	42.43	8.20	13.38	9.71	24.18
<b>RAL 20</b>	1.40	42.41	9.97	18.44	10.21	17.16

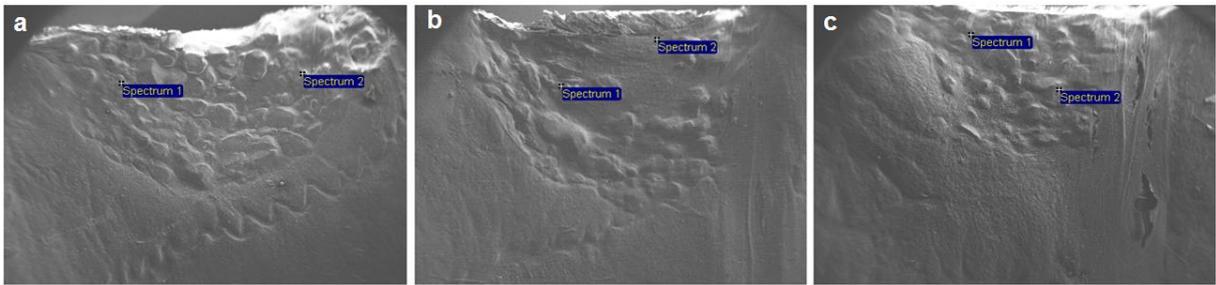


Figura 19 – Imagens dos defeitos na calvária dos ratos com osso calcificado após serem preenchidos com biovidro e diferentes concentrações de raloxifeno dos grupos (a) CTR (b) RAL10 e (c) RAL20

Com os dados na tabela, observa-se que houve formação óssea em todos os grupos estudados, porém a concentração de cálcio e potássio foi maior no grupo RAL20, que também apresentou uma diminuição na concentração de silício quando comparado com o grupo controle e com 10% de raloxifeno. Com relação as diferentes concentrações de raloxifeno quando misturadas com o biovidro, os resultados de EDS obtidos para os defeitos da calvaria mostram uma relação Ca/P do osso da calota craniana teve um valor de 1,72, que foi semelhante aos valores obtidos para os grupos controle (1,79), RAL10 (1,63) e RAL20 (1,85) e está próximo ao valor descrito na literatura (1,67) (CUNHA et al, 2006 e WANG, 2003).

## 6. Conclusões

Os resultados sugerem que processar o vidro bioativo por períodos mais longos não afetou o resultado do processo de reparo ósseo, que é comumente avaliado por meio de medidas morfológicas via micro CT. Isto pode ser devido ao tamanho das partículas, que apesar dos diferentes tempos de sonicação, variou pouco.

Com base nos resultados desta investigação preliminar, o tempo de sonicação de 15 minutos foi escolhido para o processamento de BioGran e raloxifeno pelo método sonoquímico.

Com relação as diferentes concentrações de raloxifeno quando associadas com o biovidro, os resultados de EDS obtidos para os defeitos da calvaria mostram a relação Ca/P dos grupos experimentais está próximo ao valor obtidos da calota craniana e está próximo ao valor descrito na literatura (1,67) Apesar desses valores satisfatórios, o grupo RAL10 foi o que apresentou os piores resultados em relação a quantidade e qualidade do osso, que pode ser comprovado pelos valores de fração de volume óssea e para o números trabeculares, já os valores para os grupos CTR e RAL20 apresentaram os melhores resultados.

Pelos resultados de EDS também foi possível observar que para o grupo RAL20 houve uma diminuição da concentração de sílcio no novo osso que preencheu o defeito quando comparado com o grupo CTR e RAL10, e um aumento na concentração de cálcio e fósforo quando comparados com os mesmos grupos, podendo indicar que uma concentração maior de raloxifeno influencia da degradação do sílcio no organismo. Cálcio e fósforo são os principais elementos minerais do ósseo e é relevante que o material permita que o osso cresça com uma composição semelhante a de um osso saudável.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o biovidro associado ou não com o raloxifeno é eficiente na formação óssea.

## 7. Referências

ALBREKTSON T. The Branemark osseointegrated implant. Chicago: Quintessence, 1989. 262p.

ALMEIRA, J. R. **Síntese sonoquímica de novos nanohíbridos de óxido de vanádio/polímero condutor**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia. BA, 2013.

AMADEL, S. U.; SILVEIRA, V. A. S.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R.; ROCHA, R. F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, p.5-12, 2006.

ANNIBALI S, CRISTALLI MP, DELL'AQUILA D, BIGNOZZI I, LA MONACA G, PILLONI A. Short dental implants: a systematic review. **Journal of Dent Research**, 2012 Jan; 91: 25-32.

BANG, J. H.; SUSLICK, K. S. Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials. **Advanced Materials**. v.22, p.1039-1059, 2010.

BELLON, P. A. **Síntese do biovidro e sua caracterização**. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade de São Paulo, SP 2012.

BETTI, L. V. **Análises microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos**. 2004. 152f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Baurú, 2004.

BRÅNEMARK PI, HANSSON BO, ADELL R, BREINE U, LINDSTRÖM J, HALLEN O, OHMAN A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand J Plast Reconstr Surg Suppl**, 1977;16:1-132.

BRANEMARK PI, ZARB GA, ALBREKTSON T. tissue integrated prostheses. Osseointegration in clinical dentistry. Chicago: Quintessence Co., 1985, 350p.

CALLISTER, W. D. **Fundamentos da Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma abordagem integrada**. 2ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

CAMARGO, M. **Estudos preliminares sobre a produção de nanocelulose a partir de algodão “never dried” utilizando hidrólise enzimática seguida de sonicação com ultrassom**. 2010. 168f. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. SP.

CHIAPASCO M, CASENTINI P, ZANIBONI M, CORSI E. Evaluation of peri-implant bone resorption around Straumann Bone Level implants placed in areas reconstructed with autogenous vertical onlay bone grafts. **Clin Oral Implants Res.**, 2012 Sep;23(9):1012-21.

COÊLHO, J. C. A.; KRAIEVSKI, E. S.; PEREIRA, L. C. B.; SILVA, M. C. Fisiologia da remodelação óssea: revisão da literatura. **Conexão eletrônica**, v.13, 2016.

COSTA, B. C. **Processamento sonoquímico de materiais mesoestruturados de óxido de zinco dopados com terras-raras**. 2014. 108f. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista. SP.

COSTA, E. da. **Preparação e Caracterização de um Biovidro para Preenchimento Ósseo**. 56f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR 2004.

CRUZ, A. C. C.; *et al.* **Evaluation of physical–chemical properties and biocompatibility of a microrough and smooth bioactive glass particles**. *J Mater Sci: Mater Med*, v.14, 2809 – 2817, 2008.

CUNHA, S. M.; LAZAR, D. R. R.; USSUI, V.; FANCIO, E.; LIMA, N. B. de; BRESSIANI, A. H. A. Influência da relação de Ca/P na formação de fosfatos de cálcio sintetizados

por precipitação homogênea. **Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**. 15 a 19 de novembro de 2006. Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

DAVIES JE. Mechanisms of endosseous integration. **International Journal of Prosthodont**, 1998;11(5):391-401.

DAVIES JE. Understanding peri-implant endosseous healing. **J Dent Educ.**, 2003; 8:932-49.

DELIORMANH, A. M.; YILDRIM, M. Sol-gel synthesis of 13-93 bioactive glass powders containing therapeutic agents. **Journal of the Australian Ceramics Society**. v.52, p.9-19, 2016.

DRAGE NA, PALMER RM, BLAKE G, WILSON R, CRANE F, FOFELMAN I. A comparison of bone mineral density in the spine, hip and jaws of edentulous subjects. **Clin Oral Implants Res** 2007; 18: 496-500.

DRAKE MT, KHOSLA S. Male osteoporosis. **Endocrinol Metab Clin North Am**. 2012;41(3):629–641.

ERIKSEN, E. F. *et al*. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. **Science**, v. 241, p. 84-6, 1988.

FARDIN, A. C.; JARDIM, E. C. G.; PEREIRA, F. C.; GUSKUMA, M. H.; ARANEGA, A. M.; GARCIA JUNIOR, I. R. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innov Implant J**, v.5, p.48-52, 2010.

FAVERANI, L.P.; RAMALHO-FERREIRA, G.; SANTOS, P. H.; ROCHA, E. P.; GARCIA JUNIOR, I. R.; PASTORI, C. M.; ASSUNÇÃO, W. G. Técnicas cirúrgicas para enxertia óssea dos maxilares – revisão da literatura. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.41, p.61-67, 2014.

FRANCO, F.; PÉREZ-MAQUEDA, L. A.; PÉREZ-RODRIGUEZ, J. L. The effect of ultrassound on the particle size and structural disorder of a well-ordered kaolinite. **Journal of Colloid and Interface Science**, 274, 107-117, 2004.

FURUSAWA T, MIZUNUMA K. Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone-grafting material. *Implant Dent* 1997;6:93–101.

GARTNER LP; HIATT J L. **Atlas colorido de histologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2002.

GIUSTI A, BIANCHI G. Treatment of primary osteoporosis in men. *Clin Interv Aging*. 2014 Dec 30;10:105-115

GRUBER R, STADLINGER B, TERHEYDEN H. Cell-to-cell communication in guided bone regeneration: molecular and cellular mechanisms. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Aug 23.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimento. **Química Nova**, v.33, p.1352-1358, 2010.

HENCH, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v.74, p.1487-510, 1991.

HENCH, L. L. The story of Bioglass®. **Mater Med**. v.17, p.967-978, 2006.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction**. In: **Na Introduction to Bioceramics**, Singapore: World Scientific, v.1, p.1-25, 1993.

ISIDOR F. Influence of forces on peri-implant bone. *Clin Oral Implants Res* 2006;17 Suppl 2:8-18.

ISOLA, J. G. M. P.; MORAES, P. C. Estrutura e regeneração óssea – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. v.18, 2012.

IVANOFF CJ, HALLGREN C, WIDMARK G, SENNERBY L, WENNERBERG A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO<sub>2</sub> blasted and turned titanium microimplants in humans. **Clin Oral Imp Res**. 2001.

JOHANSON C, ALBREKTSON T. Integration of screw implants in the rabbit: A 1 year follow-up of removal torque of titanium implants. ; v:2, p.69-75, 1987.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, 4457-86, 2013.

JUDAS, F.; PALMA, P.; FALACHO, R. I.; FIGUEIREDO, H. Estrutura do tecido ósseo. Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.139, 2004.

KAPLAN, F. S. (1994). Form and function of bone. In: SIMON, S.R. **Orthopaedic basic science**. Chicago: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994.

KAYATH, M. J. Raloxifeno e Osteoporose: revisão de um novo modular seletivo do receptor de estrógeno. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**. v.43, 1999.

KHOSLA S, AMIN S, ORWOLL E. Osteoporosis in men. *Endocr Rev*. 2008;29(4):441–464.

KOKUBO, T.; TAKADAMA H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v.27, p.2907-2915, 2006.

L.P. Faverani, T.O.B. Polo, G. Ramalho-Ferreira, G.A.C. Momesso, J.S. Hassumi, A.C. Rossi, A.R. Freire, F.B. Prado, E.R. Luvizuto, R. Gruber, R. Okamoto, Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats, **Clin. Oral Investig.** 22 (2018) 255–265.

LAWRENCE PT, GROTZKE MP, ROSENBLUM Y, NELSON RE, LAFLEUR J, MILLER KL, MA J, CANNON GW. The Bone Health Team. J Prim Care Community Health. 2017

LEITE, M. O. R. Tratamento da osteoporose pós-menopausa. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia.** v.43, 1999.

LEUNG KC, CHOW TW, WAT PY, COMFORT MB. Peri-implant bone loss: management of a patient. Int J Oral Maxillofac Implants 2001;16:273-277.

LIMA, S. A.; DECHICHI, P.; OLIVEIRA, N. C.; PAIVA, B. V.; ROCHA, F. S.; BATISTA, J. D. Reparo ósseo utilizando enxerto de matriz orgânica de osso cortical e medular de origem bovina associados ao plasma rico em plaqueta (PRP). **Horizonte científico.** v.11, 2013.

LISBOA-FILHO, P. N. et al. Bone repair with raloxifene and bioglass nanoceramic composite in animal experimente. **Connective tissue research.** 2018.

LUTOLF, M. P. et al. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices, **Nature Biotechnology**, v.21, n.5, p.513-518, 2003.

MARTINES, M. A.; DAVOLOS, M. R.; JAFELICCI JUNIOR, M. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química nova.** v.23, p.251-256, 2000.

MORAIS, E. F. Osteonecrose dos maxilares associado ao uso de alendronato oral em paciente sob tratamento de osteoporose. **Catussaba**, v.1, p.21-29, 2016.

OKAMOTO, R. **Medições antiosteoporose e seu efeito sobre o processo de reparo do tecido ósseo comprometido por deficiência de estrógeno.** 2016. 46f. Tese de livre docência, Universidade Estadual Paulista. SP.

OZAWA S, OGAWA T, SUKOTJO C, HASEGAWA H, NISHIMURA RD, NISHIMURA I. Bone 2002; 30(1): 137–143.

PAIVA, A. O. **Obtenção, caracterização e estudo in vitro do vidro bioativo VH30 e compósitos vidro bioativo/polihidroxitirato.** 95f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Itajubá. MG, 2005.

PEÑARROCHA-DIAGO MA, GALÁN-GIL S, CARRILLO-GARCÍA C, PEÑARROCHA-DIAGO D, PEÑARROCHA-DIAGO M. Transcrestal sinus lift and implant placement using the sinus balloon technique. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012 Jan 2012; 17: 122-8.

PUCCI, S. C. **Enxerto ósseo autógeno e implantodontia.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tuiuti, PR 2003.

QUEIROZ TP, SOUZA FÁ, OKAMOTO R, LUVIZUTO ER, MARGONAR R, GARCIA IR JR, HOCHULI- VIEIRA E. Compromised primary implant stability. J Craniofac Surg 2012;23(5):524-528.

SANTOS, M. A. B. **Síntese e caracterização de nanocompósitos de hidróxidos de terras raras e investigação da propriedade fotoluminescente.** 2016. 116f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás. GO.

SARKAR, S. K.; LEE, B. T. Synthesis of bioactive glass by microwave energy irradiation and its in-vitro biocompatibility. **Bioceramics Development and Applications.** v.1, p.1-3, 2011.

SEPULVEDA, P.; JONES, J. R.; HENCH, L. L.; Characterization of Melt-Derived 45S5 and sol-gel-derived 58S Bioactive glasses. **Journal Biomed Mater**, v. 58, p.734-740, 2001.

SHAPURIAN T, DAMOULIS P, REISER GM, GRIFFIN TJ, RAND WM. Quantitative evaluation of bone density using Hounsfield Index. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21:290-297.

SHIMANO, M. M. **Microestruturas e propriedades mecânicas de osso cortical e trabecular de ratos, após período de sustentação pela causa e exercitação.** 2006. 154p. Tese Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D. – **BIOSILICATO®: Histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade.** *Quim. Nova*, Vol 34, nº 07, 1231-1241, 2011.

STENTZ WC, MEALEY BL, NUMMIKOSKI PV, GUNSOLLEY JC, WALDROP TC. Effects of guided bone regeneration around commercially pure titanium and hydroxyapatite- coated dental implants. I. Radiographic analysis. *J Periodontol* 1997;68(3):199-208.

TABATA LF, ROCHA EP, BARAO VA, ASSUNCAO WG. Platform switching: biomechanical evaluation using three-dimensional finite element analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011;26:482-491.

TEN CATE, **Histologia bucal desenvolvimento, estrutura e função.** 5ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 95-111;p.439, 2001.

TRINO, L. D. **Desenvolvimento e otimização de materiais nanocristalinos para células solares sensibilizadas.** 2014, 105f. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista. SP.

WANTOWSKI, G. **Análise do reparo ósseo nas faturas de ângulo mandibular com fixação interna rígida – estudo em coelhos.** Dissertação de mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS 2007.

WHEELER D. L.; STOKES, K. E.; HOELLRICH, R. G.; CHAMBERLAND, D. L.; MCLOUGHLIN, S. W. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. **Journal Biomed Mater Reserch.** 527-33. 1998.

YAMAZAKI M, SHIROTA T, TOKUGAWA Y, MOTOHASHI M, OHNO K, MICHI K et al., Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;87:411-8.