

## EFEITO DOS ÓXIDOS ZnO, MgO E MnO NA BIOATIVIDADE E CITOTOXICIDADE DE UM SISTEMA SiO<sub>2</sub>·CaO(MO)·P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Lucas A. B. Santana<sup>1</sup>, Paulo H. Oliveira Júnior<sup>1</sup>, Debora S. Tavares<sup>2</sup>, Euler A. dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão (SE), Brasil

<sup>2</sup>Dep. de Educação em Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Lagarto (SE), Brasil

E-mail: lucassantanasrn@hotmail.com

**Resumo.** Os íons bivalentes Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup> desempenham importante papel na ativação de cascatas de sinalização associadas à regeneração óssea por células osteoprogenitoras ou mesmo osteoblastos já diferenciados. Os efeitos isolados de cada um desses íons são descritos na literatura, mas os efeitos combinados oriundos da adição simultânea desses íons sobre modificações estruturais, solubilidade, estabilidade térmica, bioatividade e citotoxicidade in vitro de vidros bioativos são pouco explorados. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da substituição simultânea do CaO pelos óxidos ZnO, MgO e MnO sobre sua bioatividade e citotoxicidade, conforme a composição (% em mol): 80%SiO<sub>2</sub>·(16% - x)CaO·x%MO·4%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Como resultado foi possível observar que a adição dos óxidos reduziu a bioatividade dos materiais, no entanto, o ensaio de citotoxicidade não demonstrou toxicidade aparente. Isso demonstra que o efeito dos íons metálicos sobre as células pode se sobrepor ao efeito da presença de hidroxiapatita.

**Palavras-chave:** Vidros bioativos, MnO, ZnO, MgO, Bioatividade, Citotoxicidade

### 1. INTRODUÇÃO

Os vidros bioativos são um grupo de biomateriais de superfície reativa que ao entrarem em contato com fluidos corporais sofrem uma rápida sequência de reações de dissolução e precipitação em sua superfície, que culmina na formação de uma camada de apatita carbonatada semelhante àquela presente na fase mineral óssea (Shankhwar *et al.* 2016; Wu *et al.* 2015; Gerhardt and Boccaccini 2010; Ravarian *et al.* 2010). Tal característica confere bioatividade a esses materiais, uma vez que a hidroxiapatita é o principal componente inorgânico da matriz óssea, apresenta afinidade específica para muitas proteínas adesivas, e está diretamente envolvida nos processos de mineralização e diferenciação de células ósseas (Liu *et al.* 2009). Outras propriedades comuns aos vidros bioativos são osteocondutividade, osteoindutividade e biodegradabilidade (Wu *et al.* 2015; Shankhwar *et al.* 2016; Kargozar *et al.* 2018).

Nos últimos anos, muito tem se falado sobre utilização de íons metálicos, por exemplo Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>, em associação com vidros bioativos, uma vez que esses já foram descritos na literatura por atuarem nos processos de adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas, importantes no reparo do tecido ósseo (Gentleman *et al.* 2010; Jones 2015a; Lázaro *et al.* 2014; Lee and Knowles 2017; Ma *et al.* 2010). Uma das vias utilizada para a inclusão desses elementos na rede vítrea é a substituição parcial do óxido de cálcio (CaO) presente na composição padrão do vidro pelo óxido metálico desejado durante o processo de síntese. Por meio dos processos de dissolução que acontecem na superfície dos vidros bioativos após serem expostos aos fluidos corporais, esse elementos metálicos presentes na composição são liberados em sua forma iônica, para assim desempenharem seu papel sobre as células.

O Zn<sup>2+</sup>, por exemplo, é cofator para muitas enzimas, estimula a síntese de proteínas e é essencial para a replicação do DNA. Sua deficiência pode acarretar retardo do crescimento esquelético e alterações na calcificação do tecido ósseo (Nandi *et al.* 2016). Além disso, o Zn<sup>2+</sup> possui propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias (Lang *et al.* 2007), está

envolvido na transcrição de genes de diferenciação osteoblástica, como colágeno I, fosfatase alcalina (ALP), osteopontina e osteocalcina, e é capaz de promover diretamente a formação óssea através do aumento da transcrição do gene *Runx2* envolvido na diferenciação de osteoblastos (Kwun *et al.* 2010; Goel *et al.* 2013). O  $Mg^{2+}$  desempenha um papel importante no metabolismo ósseo, interagindo diretamente com as integrinas das células osteoblásticas, que são responsáveis pela adesão e estabilidade celular sua deficiência está diretamente associada distúrbios como a osteoporose (Zreiqat *et al.* 2002; Cacciotti 2017). O íon  $Mg^{2+}$  participa de processos importantes para o reparo tecidual como adesão e estabilidade, além de estimular a proliferação, diferenciação e mineralização da matriz extracelular de células ósseas (Fernandes *et al.* 2016). O  $Mn^{2+}$  participa da remodelação da matriz extracelular (Lüthen *et al.* 2007), mineralização óssea (Torres *et al.* 2014) e adesão celular por meio da ativação de integrinas (Lüthen *et al.* 2007; Sopyan *et al.* 2011).

A adição de óxidos metálicos em substituição ao CaO, em compostos vítreos, pode produzir modificações em sua estrutura, solubilidade, estabilidade térmica e no comportamento de dissolução (Jones 2015a; Lázaro *et al.* 2014; Lee and Knowles 2017; Hoppe, Güldal, and Boccaccini 2011; Gentleman *et al.* 2010). Além disso, modificações composicionais podem influenciar na bioatividade dos vidros bioativos (Chen *et al.* 2010; Vernè *et al.* 2015).

Diante dos fatos o presente estudo propôs modificações no sistema vítreo ternário conhecido como 77S (80%SiO<sub>2</sub> – 16%CaO – 4%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> em % molar), com a substituição parcial do CaO por ZnO, MgO e MnO de forma individual e simultânea, e avaliou os efeitos dessa substituição sobre a bioatividade e citotoxicidade. O vidro bioativo 77S foi escolhido como material controle por ter sua bioatividade comprovada em diversos trabalhos (Zhong, Greenspan, and Corporation 2000; Jones 2015b; Rad and Behnamghader 2016; Berardo *et al.* 2013).

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Síntese dos materiais

Os materiais foram preparados pelo método sol-gel. Inicialmente, foram adicionados 81,96 mL de tetraetilortossilicato (TEOS) a 85,5 mL de álcool ético absoluto e a mistura foi deixada em agitação por 30 min. Em seguida, adicionaram-se 26,46 mL de água deionizada para a hidrólise ácida de TEOS e 1,2 mL de ácido acético, o catalisador da reação, e a solução foi deixada sob agitação durante 60 min. Na sequência foram adicionados 6,09 mL de trietilfosfato e 17,1 g de nitrato de cálcio tetraidratado, sob agitação contínua por 60 min cada (Pope and Mackenzie 1986). A mistura foi armazenada em recipientes fechados durante 5 dias à temperatura ambiente para permitir a formação do gel. Em seguida, o gel foi aquecido em duas etapas para promover a eliminação da água e subprodutos da reação: 1) a 60°C por 72 h e 2) a 120°C por 48 h.

Após secagem, o material (xerogel) foi triturado e, posteriormente, peneirado (Mesh 325) para obtenção na forma de pó. Pastilhas com dimensões de 9,0 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura foram produzidas a partir do xerogel em pó por prensagem uniaxial a 462,14 MPa. Por último, as amostras na forma de pastilhas foram tratadas termicamente a 700°C por 2 h (taxa de aquecimento 10°C/min).

Os sistemas de vidro modificado foram preparados conforme metodologia descrita anteriormente, porém, o CaO foi parcialmente substituído por outros óxidos (ZnO, MgO e MnO) de forma individual ou em combinação (Tabela 1). Todos os reagentes usados como precursores foram obtidos com grau analítico > 98%.

Tabela 1. Composição nominal dos biovidros produzidos neste trabalho.

Amostra	Composição (% em mol)					
	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaO	MnO	ZnO	MgO
BV	80	4	16	-	-	-
BV+Mn	80	4	10	6	-	-
BV+Zn	80	4	10	-	6	-
BV+Mg	80	4	10	-	-	6
BV+3M	80	4	10	2	2	2

## 2.2 Teste de bioatividade

Para avaliar a bioatividade dos biovidros (dissolução/precipitação) utilizou-se uma solução do tipo Kokubo (Kokubo and Takadama 2006), conhecido comumente como fluido corporal simulado (SBF), sendo este similar a fase inorgânica do plasma sanguíneo. Como a maioria dos enxertos de vidros bioativos existentes é usada na forma de grânulos e pastilhas porosas, e não de pó, os testes de bioatividade foram realizados usando pastilhas obtidas do pó do material. As pastilhas foram preparadas por prensagem uniaxial a 462,14 MPa e posteriormente foram tratadas termicamente a 700°C por 2 h (taxa de aquecimento 10°C/min). A área superficial aparente das pastilhas foi utilizada para estimar o volume do fluido de imersão de acordo com a Eq. (1) a seguir (Kokubo and Takadama 2006):

$$V_s = \frac{S_a}{10} \quad \text{Eq. (1)}$$

onde  $V_s$  é o volume (mL) de SBF usado e  $S_a$  a área (mm<sup>2</sup>) aparente da superfície da amostra. De acordo com as dimensões das pastilhas, o volume necessário calculado foi de 17 mL.

Para tanto, as amostras (pastilhas) foram imersas em SBF nos tempos de 1 e 7 dias. Após a imersão, as amostras foram lavadas com água destilada e secas a 120°C/24h.

As transformações morfológicas nas superfícies das pastilhas ocorridas durante a imersão em SBF foram acompanhadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) num microscópio JEOL 5700. Por serem não condutoras, as amostras foram metalizadas com carbono e posteriormente observadas no modo de elétrons secundários a 5 kV. Para as análises EDS, a tensão foi aumentada para 15 kV. Os testes foram realizados em triplicata.

As concentrações de Si, Ca, P, Zn, Mg e Mn presentes em SBF após os tempos de imersão foram analisadas por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), utilizando o equipamento Varian 720-ES.

## 2.3 Teste de citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada através do método colorimétrico do MTT {*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólio]*}. Osteoblastos humanos da linhagem MG-63, cedidos pela Universidade Federal Fluminense do Rio de Janeiro, foram utilizados para avaliar a citotoxicidade *in vitro* das amostras. As células foram cultivadas em meio de cultivo (DMEM) (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% de L-glutamina e 1% penicilina/estreptomicina, e mantidas em incubadora (LS Logen) com atmosfera umidificada (37°C, e 5% de CO<sub>2</sub>).

Antes do ensaio as pastilhas de biovidro foram esterilizadas em estufa a 180°C por 120 minutos (Kido 2015).

Inicialmente, as amostras foram alocadas em placas de cultura de 24 poços e expostas a 1000 µL de meio de cultura suplementado por um período de durante 2 horas para adesão das

proteínas e aclimatação das amostras. Posteriormente o meio foi retirado e cerca de  $10^5$  células suspensas em 20  $\mu\text{L}$  de meio de cultura foram inoculadas no centro do material e em poços vazios para servirem de controle. Trinta minutos após a inoculação adicionou-se 1000  $\mu\text{L}$  de meio de cultura em cada um dos poços, e as placas de cultura foram então incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Decorrido esse tempo, o meio de cultura foi removido, e adicionado 500  $\mu\text{L}$  de MTT (Sigma-Aldrich). As amostras foram recolocadas na incubadora por 3 horas, tempo previsto para o MTT ser clivado. Na sequência o MTT foi retirado e 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol acidificado foi adicionado, por um período de 10 minutos para a dissolução dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi feita em um leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Reade) com um filtro de 570 nm. Como controle positivo (citotóxico) do experimento, células foram inoculadas diretamente na placa e posteriormente adicionou-se uma solução de 100% de Triton X-100 e como o controle negativo (não citotóxico) células foram inoculadas na placa e depois foi adicionado DMEM (Lupu and Popescu 2013; Yang *et al.* 2015).

## 2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 e os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. A significância estatística dos dados obtidos foi avaliada através de análise de variância ANOVA seguido de correção por teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar os grupos. A diferença estatística foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 BIOATIVIDADE

Pelas imagens obtidas por MEV (Fig. 1) é possível observar que a superfície do vidro bioativo controle (BV) foi completamente modificada após imersão em SBF. Após 7 dias de imersão é possível observar a presença de aglomerados globulares depositados na superfície, sugerindo a formação de uma camada de hidroxiapatita (Caldas, Silva, and Araujo 2018). As amostras em que o CaO foi substituído pelos óxidos metálicos não apresentaram modificações significativas na superfície, indicando que a adição dos óxidos interferiu na dinâmica de dissolução/reprecipitação dos materiais.

A bioatividade de vidros bioativos com adição de ZnO apresenta resultados controversos. Por um lado alguns estudos já demonstraram que a presença de ZnO na composição de vidros bioativos tende a facilitar a formação da camada de hidroxiapatita em sua superfície após imersão e SBF, dessa forma melhorando sua bioatividade (Lusvardi *et al.* 2008; Hoppe, Güldal, and Boccaccini 2011). Por outro lado, outros estudos já demonstraram que a adição de ZnO prejudica a dinâmica de dissolução dos vidros bioativos, inibindo a formação da camada de hidroxiapatita em sua superfície (Aina *et al.* 2007; Haimi *et al.* 2009). Também já foi demonstrado que a substituição de CaO por ZnO reduz a taxa de degradação dos vidros bioativos, o que acaba retardando a formação da camada superficial de hidroxiapatita (Balamurugan *et al.* 2007).

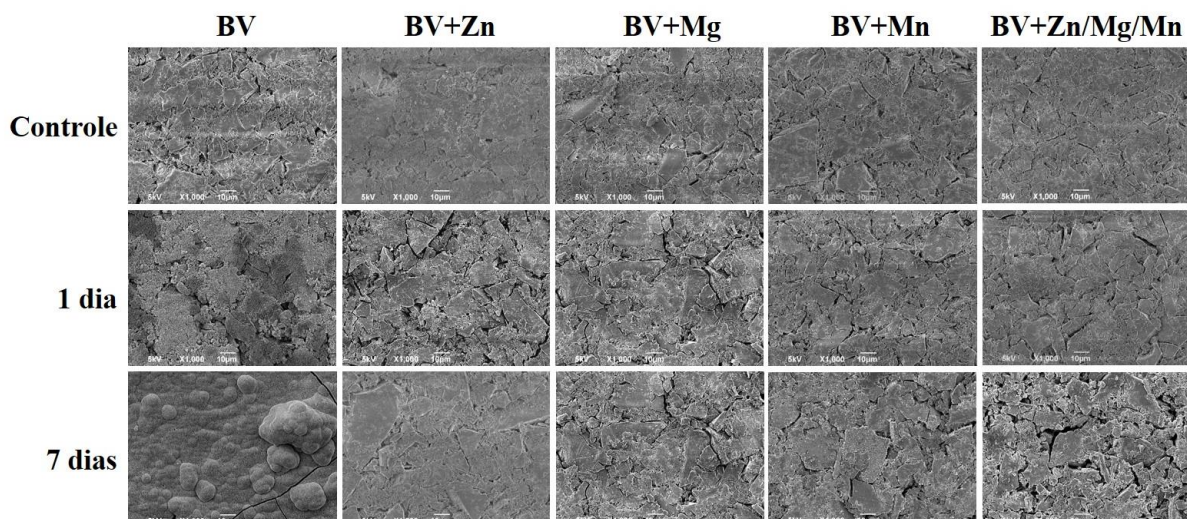


Figura 1. Imagens de MEV das superfícies das amostras antes e após 1 e 7 dias de imersão em SBF. Ampliação: 1.000 ×; barra = 10 µm.

Comportamento semelhante ao citado anteriormente pode ser observado para as amostras contendo MgO. O MgO pode atuar tanto como modificador de rede como formadores de rede, e dessa forma influenciar na dissolução e bioatividade *in vitro* dos vidros bioativos. Estudos apontam que, a depender da concentração, o MgO pode prejudicar o crescimento de cristais de apatita (Pereira *et al.* 2004; Karakassides, Saranti, and Koutselas 2004; Moya *et al.* 1994). O mesmo já foi descrito para a substituição de CaO por MnO (Barrioni *et al.* 2017; Torres *et al.* 2014).

As análises de EDS (Fig. 2) confirmam os achados observados nas imagens de MEV, onde apenas a amostra BV sofreu alterações no perfil dos elementos presentes em sua superfície, condizentes com o que se espera observar em uma amostra com precipitação de hidroxiapatita, após imersão em SBF. Isso fica demonstrado pelo aumento abrupto nos conteúdos de Ca e P na amostra BV e diminuição substancial de Si, indicando a deposição do fosfato de cálcio na superfície acaba bloqueando a detecção de Si.

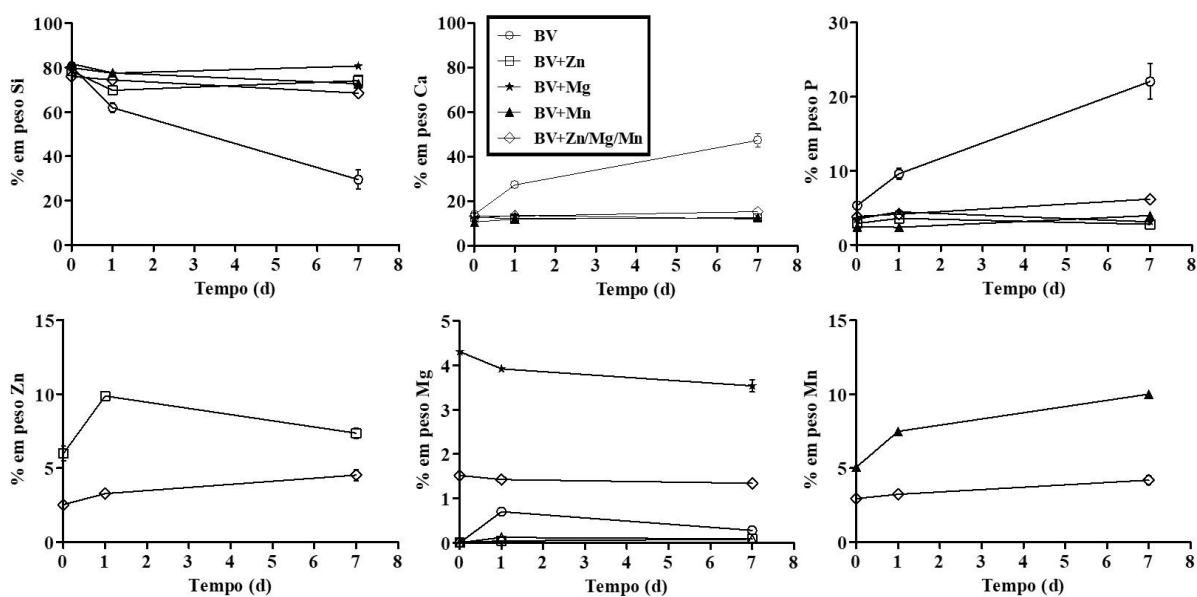


Figura 2. Análise de EDS das amostras antes e após a imersão em meio SBF ao longo de 7 dias.

Para complementar os resultados anteriores a concentração (ppm) de espécies libertadas após a imersão das pastilhas de vidro bioativo em SBF foi monitorizada utilizando espectroscopia ICP-OES (Fig. 3).

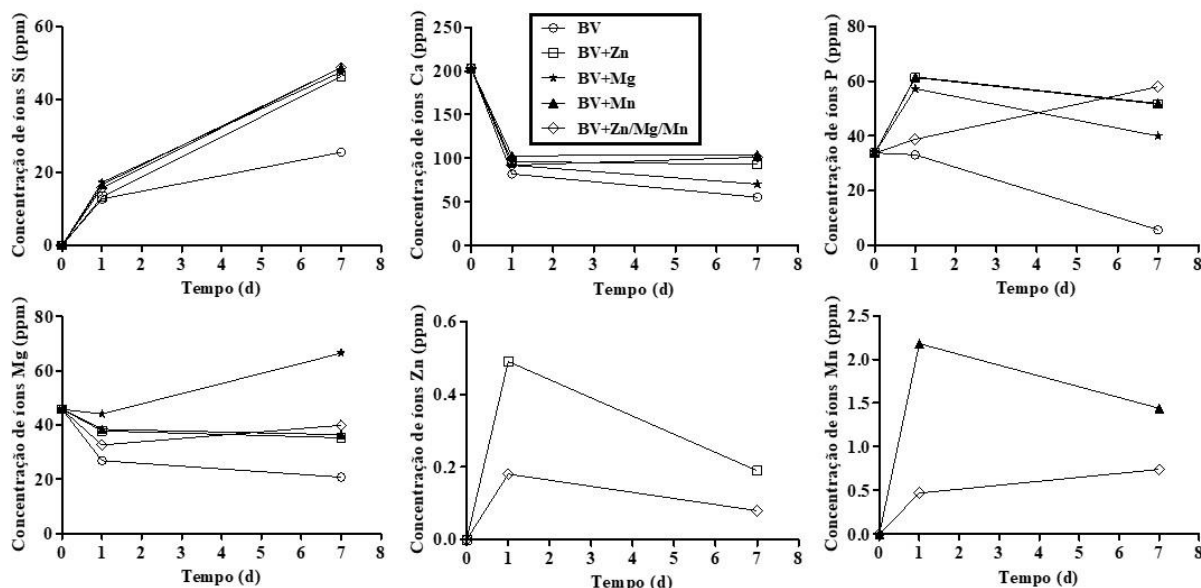


Figura 3. Concentrações dos íons Si, Ca, PO, Zn, Mg e Mn no meio SBF antes e após a imersão das amostras de vidro bioativo por 1 e 7 dias.

As mudanças na composição do SBF durante o teste de bioatividade *in vitro* podem ser usadas como um método indireto para compreender os processos que estão ocorrendo na superfície do vidro. Primeiro, como o vidro é parcialmente solúvel, espera-se que ocorra um aumento inicial nos íons Si, Ca e P na solução. Assim, a camada de apatita pode se formar na superfície do vidro bioativo como consequência da difusão de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do vidro, formando uma camada de sílica amorfa e posterior migração de íons  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  para a interface (Barrioni *et al.* 2017). Além disso, os grupos Si-OH na superfície do vidro bioativo também podem induzir a nucleação heterogênea de apatita (De Oliveira *et al.* 2013).

O meio SBF não possui  $\text{SiO}_4^{4-}$  em sua composição, portanto a detecção desse íon no meio está associada à dissolução dos vidros bioativos. As reações de dissolução começam logo após a imersão do vidro bioativo em SBF, através da reação entre a água e as unidades tetraédricas de  $\text{SiO}_4$  das cadeias de silicato. A ruptura induzida pela hidratação dessas cadeias de silicato causa a liberação de  $\text{SiO}_4^{4-}$  solúvel ou mesmo de pequenas cadeias no meio (Lázaro *et al.* 2014). Analisando a concentração de  $\text{SiO}_4^{4-}$  após a imersão das amostras no meio podemos observar que para o primeiro dia as amostras apresentaram similaridade. Todavia, após sete dias a amostra BV teve uma substancial diminuição nos níveis de  $\text{SiO}_4^{4-}$  quando comparada com as outras amostras, provavelmente em virtude da precipitação de hidroxiapatita em sua superfície, o que acaba dificultando a liberação de  $\text{SiO}_4^{4-}$  para o meio. Sem deposição de hidroxiapatita, as superfícies ficaram expostas e consequentemente sofrem maior dissolução, liberando mais  $\text{SiO}_4^{4-}$  para o meio.

As concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  diminuíram consideravelmente no meio contendo a amostra BV ao longo do tempo, demonstrando que esses íons foram precipitados na superfície da amostra. Tal comportamento não se repetiu para as outras amostras, levando mais uma vez à percepção de que a substituição de CaO pelos outros óxidos metálicos provocou alteração na dinâmica de dissolução dos materiais. A adição de íons modificadores na rede vítrea produz uma precipitação mais lenta de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  na superfície dos materiais,

provavelmente devido à competição entre esses íons em solução com as espécies de fosfato (Bejarano, Caviedes, and Palza 2015).

Quando se observa a liberação dos íons metálicos ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ ) nota-se a presença do  $Mg^{2+}$  em todas as amostras, visto que o mesmo está presente no meio SBF mesmo antes da imersão das amostras. No decorrer dos dias podemos observar que os íons metálicos estão sendo liberados para o meio. Dos íons em estudo, o  $Zn^{2+}$  foi o que mais permaneceu na rede do vidro, indicando uma maior força de ligação do mesmo com a rede.

#### 4.2 CITOTOXICIDADE

Os resultados da viabilidade celular após o contato de 24 horas das células com os materiais estão representados na Fig. 4. Para a metodologia adotada, quanto maior os valores de absorbância (570 nm) maior o número de células vivas e, por conseguinte, menor a citotoxicidade.

Comparando o controle negativo com os materiais em estudo, fica demonstrado que os mesmos não apresentam toxicidade aparente para as células. Além disso, as amostras BV e BV+Mg apresentam valores de absorbância significativamente mais elevados que o controle negativo, indicando que em um período de 24 horas essas amostras apresentavam uma maior densidade celular. As demais amostras não tiveram diferença significativa quando comparadas com o controle negativo. Quando se compara as amostras de vidro bioativo com substituição de CaO pelos óxidos metálicos com a amostra controle BV podemos observar que ocorre diferença significativa para as amostras BV+Zn e BV+Mg. No caso da amostra BV+Zn ocorreu uma diminuição significativa da absorbância em relação a BV, indicando uma menor quantidade de células vivas após as 24 horas do ensaio. Já para a amostra BV+Mg ocorre um aumento significativa da absorbância em relação a BV, indicando um aumento no quantitativo de células. As amostras BV+Mn e BV+Zn/Mg/Mn não tiveram diferença significativa quando comparadas a BV. Com essa análise podemos demonstrar que os materiais produzidos não apresentam toxicidade para as células após o contato de um dia.

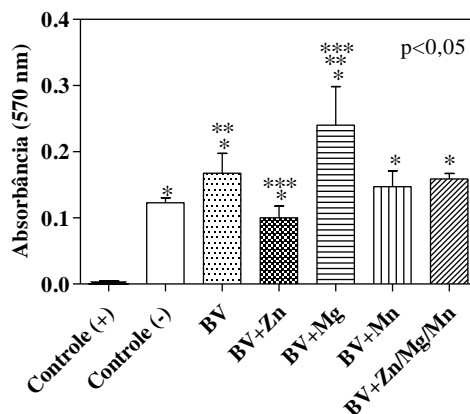


Figura 4. Teste de citotoxicidade das amostras de vidro bioativo. \* Diferença significativa ( $n = 10$ ;  $p < 0,05$ ) do controle (+) em relação aos demais grupos, \*\* diferença significativa do controle (-) em relação as amostras de vidro bioativo e \*\*\* diferença significativa de BV em relação as amostras com adição dos óxidos metálicos.

Estudos já demonstraram que adição individual de ZnO, MgO e MnO em vidros bioativos na concentração utilizada nesse estudo não produziram toxicidade aparente para as células (Balamurugan *et al.* 2007; Oki *et al.* 2004; Barrioni *et al.* 2017; Lusvardi *et al.* 2008). Ao associar o resultado de citotoxicidade com os de bioatividade podemos sugerir que as amostras com adição dos óxidos metálicos, mesmo sem formação de hidroxiapatita na



superfície, não influenciaram negativamente o comportamento celular após 24 horas de contato com o material, exceto para a amostra BV+Zn, em que ocorreu uma redução significativa de células viáveis quando comparada com BV. Em contrapartida, a amostra BV+Mg obteve resultado significativamente superior a BV, mesmo sem o desenvolvimento de uma camada de hidroxiapatita na superfície. Isso pode indicar um efeito positivo proveniente da ação dos íons metálicos sobre as células, pois apesar de não formarem camada de apatita as amostras BV+Mg, BV+Mn e BV+Zn/Mg/Mn continuam com viabilidade em igual nível ou superior a amostra BV. Isso demonstra que esses elementos tiveram um efeito positivo na viabilidade, equiparável a formação da camada de hidroxiapatita presente em BV. Esses resultados expressam a necessidade de estudos mais aprofundados para avaliar com maior clareza o efeito dos íons metálicos sobre as células.

#### 4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados fica evidente que a adição dos óxidos prejudicou a formação da camada superficial de hidroxiapatita e, conseqüentemente, reduziu a bioatividade dos materiais. No entanto, o ensaio de citotoxicidade não demonstrou toxicidade aparente, mesmo se os óxidos reduziram a bioatividade dos vidros. Isso demonstra que o efeito dos íons metálicos sobre as células pode se sobrepor ao efeito da presença de hidroxiapatita. Outros estudos estão sendo realizados para confirmar o efeito dos óxidos sobre o comportamento celular.

#### AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### REFERÊNCIAS

- Aina, Valentina, Alessandra Perardi, Loredana Bergandi, Gianluca Malavasi, Ledi Menabue, Claudio Morterra, and Dario Ghigo. (2007). "Cytotoxicity of Zinc-Containing Bioactive Glasses in Contact with Human Osteoblasts" 167: 207–18.
- Balamurugan, Anbalagan, Gerard Balossier, Sanjeevi Kannan, Jean Michel, Avito H S Rebelo, and Jose M F Ferreira. (2007). "Development and in Vitro Characterization of Sol – Gel Derived CaO–P2O5–SiO2–ZnO Bioglass" 3: 255–62.
- Barrioni, Breno Rocha, Ana Celeste Oliveira, Maria de Fátima Leite, and Marivalda de Magalhães Pereira. (2017). "Sol–gel-Derived Manganese-Releasing Bioactive Glass as a Therapeutic Approach for Bone Tissue Engineering." *Journal of Materials Science* 52 (15): 8904–27.
- Bejarano, Julian, Pablo Caviades, and Humberto Palza. (2015). "Sol – Gel Synthesis and in Vitro Bioactivity of Copper and Zinc-Doped Silicate Bioactive Glasses and Glass-Ceramics." *Biomedical Materials* 10 (2): 1–13.
- Berardo, Enrico, Alfonso Pedone, Piero Ugliengo, and Marta Corno. (2013). "DFT Modeling of 45S5 and 77S Soda-Lime Phospho-Silicate Glass Surfaces: Clues on Different Bioactivity Mechanism."
- Cacciotti, Ilaria. (2017). "Bivalent Cationic Ions Doped Bioactive Glasses : The Influence of Magnesium, Zinc, Strontium and Copper on the Physical and Biological Properties." *Journal of Materials Science* 52 (15): 8812–8831.
- Caldas, Silmara, Gilderman Silva, and Euler Araujo. (2018). "Ordering in Sol-Gel-Derived Bioactive Glasses and Its Influence on the Dissolution / Precipitation Behavior in a Complex Culture Medium." *Journal of Non-Crystalline Solids* 494 (April): 50–58.
- Chen, Q Z, Y Li, L Y Jin, J M Quinn, and P A Komesaroff. (2010). "A New Sol-Gel Process for Producing Na(2)O-Containing Bioactive Glass Ceramics." *Acta Biomater* 6 (10): 4143–53.
- Fernandes, João S., Piergiorgio Gentile, Robert Moorehead, Aileen Crawford, Cheryl A. Miller, Ricardo A. Pires, Paul V. Hatton, and Rui L. Reis. (2016). "Design and Properties of Novel Substituted Borosilicate



- Bioactive Glasses and Their Glass-Ceramic Derivatives.” *Crystal Growth and Design* 16 (7): 3731–40.
- Gentleman, Eileen, Yann C Fredholm, Gavin Jell, Nasrin Lotfibakhshaiesh, Matthew D O Donnell, Robert G Hill, and Molly M Stevens. (2010). “Biomaterials The Effects of Strontium-Substituted Bioactive Glasses on Osteoblasts and Osteoclasts in Vitro.” *Biomaterials* 31 (14): 3949–56.
- Gerhardt, Lutz-christian, and Aldo R Boccaccini. (2010). “Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering,” 3867–3910.
- Goel, Ashutosh, Saurabh Kapoor, Antonio Tilocca, and R Rajagopal. (2013). “Structural Role of Zinc in Biodegradation of Alkali-Free Bioactive Glasses,” 3073–82.
- Haimi, Suvi, Giada Gorianc, Loredana Moimas, Bettina Lindroos, Heini Huhtala, Sari Ra, Hannu Kuokkanen, George K Sa, Susanna Miettinen, and Riitta Suuronen. (2009). “Characterization of Zinc-Releasing Three-Dimensional Bioactive Glass Scaffolds and Their Effect on Human Adipose Stem Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation” 5: 3122–31.
- Hoppe, Alexander, Nusret S. Güldal, and Aldo R. Boccaccini. (2011). “A Review of the Biological Response to Ionic Dissolution Products from Bioactive Glasses and Glass-Ceramics.” *Biomaterials* 32 (11): 2757–74.
- Jones, Julian R. (2015a). “Reprint of: Review of Bioactive Glass: From Hench to Hybrids.” *Acta Biomaterialia* 23 (S): S53–82.
- Jones, Julian R. (2015b). “Acta Biomaterialia Reprint of : Review of Bioactive Glass : From Hench to Hybrids.” *Acta Biomaterialia* 23: S53–82.
- Karakassides, M. A., A. Saranti, and I. Koutselas. (2004). “Preparation and Structural Study of Binary Phosphate Glasses with High Calcium and/or Magnesium Content.” *Journal of Non-Crystalline Solids* 347 (1–3): 69–79.
- Kargozar, Saeid, Francesco Baino, Sepideh Hamzehlou, Robert G Hill, and Masoud Mozafari. (2018). “Bioactive Glasses : Sprouting Angiogenesis in Tissue Engineering.” *Trends in Biotechnology* 36 (4): 430–44.
- Kido, Hueliton Wilian. (2015). “Ação Da Vitrocerâmica Bioativa (BIOSILICATO®) No Processo de Reparação Óssea Em Ratos.”
- Kokubo, Tadashi, and Hiroaki Takadama. (2006). “How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity?” 27: 2907–15.
- Kwun, In Sook, Young Eun Cho, Ria Ann R. Lomeda, Hong In Shin, Je Yong Choi, Young Hee Kang, and John H. Beattie. (2010). “Zinc Deficiency Suppresses Matrix Mineralization and Retards Osteogenesis Transiently with Catch-up Possibly through Runx 2 Modulation.” *Bone* 46 (3): 732–41.
- Lang, Carol, Chiara Murgia, Mary Leong, Lor-wai Tan, Giuditta Perozzi, Darryl Knight, Richard Ruffin, and Peter Zalewski. (2007). “Anti-Inflammatory Effects of Zinc and Alterations in Zinc Transporter mRNA in Mouse Models of Allergic Inflammation,” 577–84.
- Lázaro, Gilderman Silva, Silmara Caldas Santos, Cristiane Xavier Resende, and Euler Araujo Dos Santos. (2014). “Individual and Combined Effects of the Elements Zn, Mg and Sr on the Surface Reactivity of a SiO<sub>2</sub>?CaO??Na<sub>2</sub>O??P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Bioglass System.” *Journal of Non-Crystalline Solids* 386: 19–28.
- Lee, In-ho, and Jonathan Campbell Knowles. (2017). “Effects of Magnesium Content on the Physical, Chemical and Degradation Properties in a MgO-CaO-Na<sub>2</sub>O-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Glass.” *Journal of Non-Crystalline Solids* 363 (January 2013): 57–63.
- Liu, YuKan, GuangChuan Wang, YuRong Cai, HuiJiao Ji, GuoShun Zhou, XiaoLi Zhao, RuiKang Tang, and Ming Zhang. (2009). “In Vitro Effects of Nanophase Hydroxyapatite Particles on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 90 (4): 1083–91.
- Lupu, A R, and T Popescu. (2013). “Toxicology in Vitro The Noncellular Reduction of MTT Tetrazolium Salt by TiO<sub>2</sub> Nanoparticles and Its Implications for Cytotoxicity Assays.” *Toxicology in Vitro* 27 (5): 1445–50.
- Lusvardi, G., G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, A. Pedone, U. Segre, V. Aina, et al. (2008). “Journal of Biomaterials Applications.”
- Lüthen, Frank, Ulrike Bulnheim, Petra D. Müller, Joachim Rychly, Henrike Jesswein, and J. G Barbara Nebe. (2007). “Influence of Manganese Ions on Cellular Behavior of Human Osteoblasts in Vitro.” *Biomolecular Engineering* 24 (5): 531–36.
- Ma, J, C Z Chen, D G Wang, Y Jiao, and J Z Shi. (2010). “Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Effect of Magnesia on the Degradability and Bioactivity of Sol – Gel Derived SiO<sub>2</sub> – CaO – MgO – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> System Glasses” 81: 87–95.
- Moya, J. S., A. P. Tomsia, A. Pazo, C. Santos, and F. Guitián. (1994). “In Vitro Formation of Hydroxylapatite Layer in a MgO-Containing Glass.” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5 (8): 529–32.
- Nandi, Samit Kumar, Arnab Mahato, Biswanath Kandu, and Prasenjit Mukherjee. (2016). “Doped Bioactive Glass Materials in Bone Regeneration.” In *Advanced Techniques in Bone Regeneration*, 275–328.
- Oki, Aderemi, Bushra Parveen, Safiyyah Hossain, S Adeniji, and Henry Donahue. (2004). “Preparation and in Vitro Bioactivity of Zinc Containing Sol-Gel – Derived Bioglass Materials.” *Wiley InterScience*, 216–21.

- Oliveira, Agda Aline Rocha De, Dickson Alves De Souza, Luisa Lima Silveira Dias, Sandhra Maria De Carvalho, Herman Sander Mansur, and Marivalda De Magalhães Pereira. (2013). "Synthesis, Characterization and Cytocompatibility of Spherical Bioactive Glass Nanoparticles for Potential Hard Tissue Engineering Applications." *Biomedical Materials (Bristol)* 8 (2): 1–14.
- Pereira, D., S. Cachinho, M. C. Ferro, and M. H.V. Fernandes. (2004). "Surface Behaviour of High MgO-Containing Glasses of the Si-Ca-P-Mg System in a Synthetic Physiological Fluid." *Journal of the European Ceramic Society* 24 (15–16): 3693–3701.
- Pope, E J A, and J D Mackenzie. (1986). "SOL-GEL PROCESSING II. The Role of the Catalyst OF SILICA" 7.
- Rad, Hediye N, and Aliasghar Behnamghader. (2016). "Preparation of Bioactive Glass 77S for Bone Tissue Engineering Applications Introduction : " 3 (4): 115–21.
- Ravarian, R., F. Moztaazadeh, M. Solati Hashjin, S. M. Rabiee, P. Khoshakhlagh, and M. Tahriri. (2010). "Synthesis, Characterization and Bioactivity Investigation of Bioglass/Hydroxyapatite Composite." *Ceramics International* 36 (1): 291–97.
- Shankhwar, Nisha, Manishekhar Kumar, Biman B. Mandal, and A. Srinivasan. (2016). "Novel Polyvinyl Alcohol-Bioglass 45S5 Based Composite Nanofibrous Membranes as Bone Scaffolds." *Materials Science and Engineering C* 69: 1167–74.
- Sopyan, I., S. Ramesh, N. A. Nawawi, A. Tampieri, and S. Sprio. (2011). "Effects of Manganese Doping on Properties of Sol-Gel Derived Biphasic Calcium Phosphate Ceramics." *Ceramics International* 37 (8): 3703–15.
- Torres, P. M.C., S. I. Vieira, A. R. Cerqueira, S. Pina, O. A.B. Da Cruz Silva, J. C.C. Abrantes, and J. M.F. Ferreira. (2014). "Effects of Mn-Doping on the Structure and Biological Properties of  $\beta$ -Tricalcium Phosphate." *Journal of Inorganic Biochemistry* 136: 57–66.
- Vernè, E., S. Ferraris, C. Cassinelli, and A. R. Boccaccini. (2015). "Surface Functionalization of Bioglass With Alkaline Phosphatase." *Surface and Coatings Technology* 264: 132–39.
- Wu, Xiaoli, Guolong Meng, Shanling Wang, Fang Wu, Wanxia Huang, and Zhongwei Gu. (2015). "Zn and Sr Incorporated 64S Bioglasses: Material Characterization, in-Vitro Bioactivity and Mesenchymal Stem Cell Responses." *Materials Science and Engineering C* 52: 242–50.
- Yang, Yang, Yun Lu, Qian-yuan Wu, Hong-ying Hu, Ying-hua Chen, and Wan-li Liu. (2015). "Ecotoxicology and Environmental Safety Evidence of ATP Assay as an Appropriate Alternative of MTT Assay for Cytotoxicity of Secondary Effluents from WWTPs." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122: 490–96.
- Zhong, Jipin, David C Greenspan, and Usbiomaterials Corporation. (2000). "Processing and Properties of Sol – Gel Bioactive Glasses," no. July: 694–701.
- Zreiqat, H., C. R. Howlett, A. Zannettino, P. Evans, G. Schulze-Tanzil, C. Knabe, and M. Shakibaei. (2002). "Mechanisms of Magnesium-Stimulated Adhesion of Osteoblastic Cells to Commonly Used Orthopaedic Implants." *Journal of Biomedical Materials Research* 62 (2): 175–84.

## EFFECT OF ZnO, MgO AND MnO OXIDES ON THE BIOACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF A $\text{SiO}_2\cdot\text{CaO}(\text{MO})\cdot\text{P}_2\text{O}_5$ SYSTEM

Lucas A. B. Santana<sup>1</sup>, Paulo H. Oliveira Júnior<sup>1</sup>, Debora S. Tavares<sup>2</sup>, Euler A. dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. of Materials Science and Engineering, Federal University of Sergipe, São Cristóvão (SE), Brazil

<sup>2</sup>Dep. of Health Education, Federal University of Sergipe, Lagarto (SE), Brazil

E-mail: lucassantanasrn@hotmail.com

**Abstract.** Bivalent ions  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  play an important role in the activation of signaling cascades associated with bone regeneration by already differentiated osteoprogenitor cells or even osteoblasts. The isolated effects of each of these ions are described in the literature, but the combined effects of the simultaneous addition of these ions on structural modifications, solubility, thermal stability, bioactivity and in vitro cytotoxicity of bioactive glasses are little explored. In this context, the present study aimed to evaluate the effects of simultaneous replacement of CaO by oxides ZnO, MgO and MnO on their bioactivity and cytotoxicity, according to the composition (mol%):  $80\%\text{SiO}_2\cdot(16\% - x)\text{CaO}\cdot x\%\text{MO}\cdot 4\%\text{P}_2\text{O}_5$ . As a result it was observed that the addition of oxides reduced the bioactivity of the materials, however, the cytotoxicity assay showed no apparent toxicity. This demonstrates that the effect of metal ions on cells may overlap with the effect of the presence of hydroxyapatite.

**Keyword:** Bioactive glasses, MnO, ZnO, MgO, Bioactivity, Cytotoxicity