
Análise morfológica e elemental da superfície de uma vitrocerâmica implantada em calvária de rato utilizando MEV e EDX

Morphological and elemental analysis of the surface of a glass-ceramic implanted in a rat calvaria using SEM and EDX

Maurício Mitsuo Monção

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

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Brasil

E-mail: maurimitsuo@yahoo.com.br

Carina Soares do Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0619-8313>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Brasil

E-mail: carinaqmc@gmail.com

Isabela Cerqueira Barreto

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

Universidade Federal da Bahia, Brasil

E-mail: isabelacbarreto@hotmail.com

Roberto Paulo Correia de Araújo

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

Universidade Federal da Bahia, Brasil

E-mail: rpcamtba@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a morfologia da superfície e a composição elemental de uma vitrocerâmica desenvolvida com diferentes proporções de wollastonita (W) e fosfato tricálcico (TCP) implantada em calvária de rato. A vitrocerâmica foi preparada com mistura de pós de W e TCP em proporções (W%/TCP%) iguais a 20/80%, 60/40% e 80/20%, seguida de sinterização e processamento para obtenção de grânulos com tamanhos entre 400 e 600 μm , que foram implantados em calvária de rato, e analisado nos pontos biológicos de 7, 15 e 45 dias após a implantação. Para análise morfológica, as amostras foram micrografadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e analisadas no software ImageJ. A análise elemental foi realizada utilizando espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX). Os resultados demonstraram que as diferentes proporções de W e TCP promoveram diferentes modificações na microestrutura da vitrocerâmica remanescente ao longo dos pontos biológicos, além de apresentarem diferentes concentrações de O, Si, Ca e P. Conclui-se que as diferentes proporções de W e TCP conferiram à vitrocerâmica diferentes comportamentos de biodegradabilidade após implantação em sítio ósseo.

Palavras-chave: Vitrocerâmica; Microscopia eletrônica de varredura; Espectroscopia de raios X.

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the surface morphology and elemental composition of a glass-ceramic developed with different proportions of wollastonite (W) and tricalcium phosphate (TCP) implanted in a rat calvaria. The glass-ceramic was prepared with a mixture of W and TCP powders in proportions (W%/TCP%) equal to 20/80%, 60/40% and 80/20%, followed by sintering and processing to obtain granules with sizes between 400 and 600 μm , which were implanted in rat calvaria and analyzed at biological points of 7, 15 and 45 days after implantation. For morphological analysis, the samples were micrographed under a scanning electron microscope (MEV) and analyzed using the software ImageJ. The elemental analysis was carried out using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX). The results demonstrated that the different proportions of W and TCP promoted different changes in the microstructure of the remaining glass-ceramic along the biological points, as well as presenting different concentrations of O, Si, Ca and P. It is concluded that the different proportions of W and TCP gave the glass-ceramic different biodegradability behaviors after implantation in a bone site.

Keywords: Glass-ceramics; Scanning electron microscopy; X-ray spectroscopy.

INTRODUÇÃO

Extensas perdas ósseas, podem ser particularmente graves, em situações ocasionadas por traumas, doenças degenerativas e outras etiologias. Nessas condições, o tratamento ideal deve proporcionar a formação de novo tecido ósseo no local da lesão, com características e funcionamento fisiológico semelhantes ao tecido ósseo nativo (AYKORA e UZUN, 2024). No entanto, até o presente momento não se encontrou um substituto ósseo ideal para o tratamento de extensas perdas ósseas. Pesquisadores têm investigado diferentes biomateriais sintéticos, incluindo metais, cerâmicas e polímeros, que possam favorecer o processo de regeneração do tecido ósseo, nas situações em que o organismo apresenta limitações regenerativas (SHAO et al., 2022; GIRÓN *et al.*, 2021).

Entre os biomateriais pesquisados, a vitrocerâmica a base de wollastonita (W) e fosfato tricálcico (TCP) têm demonstrado resultados promissores para a regeneração óssea (MONÇÃO *et al.*, 2022; ZENEBE, 2022; SANTOS *et al.*, 2021; BARBOSA *et al.*, 2020). Estudos demonstram que a mistura e sinterização de pós dos minerais W e TCP resulta em biomaterial vitrocerâmico, que agrega as propriedades de ambos minerais em um produto único, sendo possível obter diferentes formatos como grânulos, esferas, cilindros, arcabouços tridimensionais (*scaffold*), e outros formatos. Minarelli *et al.* (2008) investigaram uma biocerâmica de TCP dopada com W e observaram alta taxa de biodegradação e formação de tecido ósseo em tíbias de ratos. Barbosa *et al.* (2020) verificaram *in vitro* que células aderiram a superfície da vitrocerâmica a base de TCP e

W, demonstrando caráter osteocondutivo. Também, o referido estudo demonstrou que o implante da vitrocerâmica em modelo experimental foi considerada segura pelos autores. Já no estudo de Santos *et al.* (2021) a vitrocerâmica a base de W e TCP foi implantada em defeito ósseo confeccionado em calvária de rato, concluindo que houve notória bioatividade para regeneração óssea. De fato, estudos têm demonstrado que a vitrocerâmica a base de W e TCP apresenta potencial para reconstituir a estrutura do tecido ósseo.

Apesar das evidências do bom desempenho, outros estudos demonstram a necessidade de ajustar a biodegradabilidade da vitrocerâmica a base de W e TCP. Por exemplo, Shao *et al.* (2017) desenvolveram um scaffold biocerâmico utilizando W e TCP, dopado com magnésio, e concluíram que a adição da forma alotrópica de β -TCP equilibrou as propriedades mecânicas da vitrocerâmica, favorecendo sua estabilidade in vitro em meio a fluido corporal simulado. Dessa forma, entende-se que estudos in vivo são necessários para maior entendimento da biodegradabilidade da vitrocerâmica, após implantação em sítio ósseo, considerando que a mesma deve ser gradualmente substituída pelo novo tecido ósseo, sem alteração dimensional e/ou redução das suas propriedades mecânicas (DINGLINGG e JIANDONG, 2022).

Outrossim, sabe-se que as características da superfície de um biomaterial determinam sua interação com fluidos, tecidos e outros componentes orgânicos após sua implantação em organismo vivo, interferindo diretamente na sua biodegradabilidade. Portanto, este estudo buscou analisar a morfologia da superfície e a composição elementar de uma vitrocerâmica desenvolvida com diferentes proporções de wollastonita (W) e fosfato tricálcico (TCP), após implantação em calvária de rato, a fim de maior compreensão do processo de biodegradabilidade. Espera-se que os resultados proporcionem subsídios para o desenvolvimento de biomateriais a base de W e TCP para aplicações óssea, com maior controle da biodegradabilidade, ajustados ao processo natural de reparação do tecido ósseo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo exploratório cuja as amostras analisadas pertencem ao banco de amostras do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, procedentes de um estudo

anterior que avaliou uma vitrocerâmica desenvolvida com diferentes proporções de W e TCP, com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (protocolo 128-2017).

Vitrocêramica e implantação em modelo experimental

A vitrocerâmica utilizada foi obtida com a mistura e sinterização de pós dos minerais W e TCP, com três diferentes proporções de W%/TCP% (20/80, 60/40 e 80/20), que foram processadas para obtenção de grânulos com tamanho entre 400 - 600 μm , e implantadas em defeito ósseo crítico circular confeccionado em calvária de rato com de 8 mm de diâmetro. Os animais foram eutanasiados nos pontos biológicos de 7, 15 e 45 dias após implantação da vitrocerâmica, tendo as calvárias removidas e conservadas em formol tamponado 4%, guardadas em geladeira com temperatura entre 4 e 8 °C. Para o presente estudo, com objetivo de analisar a morfologia da superfície e a composição elementar da vitrocerâmica, selecionou-se amostras representativas da vitrocerâmica que serviram de referências para as análises após implantação no modelo experimental. Também, selecionou-se por conveniência 9 calvárias de rato que receberam o implante da vitrocerâmica, representativas das três diferentes composições de W%/TCP% e dos pontos biológicos de interesse, conforme apresenta o quadro 1.

Quadro 1 - Identificação das amostras do estudo

VITROCERÂMICA	Pontos biológicos das análises		
	(dias após implantação no modelo experimental)		
20/80	20/80-7d	20/80-15d	20/80-45d
60/40	60/40-7d	60/40-15d	60/40-45d
80/20	80/20-7d	80/20-15d	80/20-45d
Total = 12 amostras			

Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

Preparo das amostras de calvárias

As calvárias foram lavadas em solução de NaCl a 0,9% para retirada do excesso de solução formol, e os tecidos moles superficiais removidos. De cada calvária foi retirado apenas 1 fragmento da porção central, que incluiu o local da implantação da vitrocerâmica

e osso adjacente, com dimensões de 1 mm de largura por 1cm de comprimento. Para tanto utilizou-se um disco diamantado acoplado a um motor de alta rotação, e irrigação de soro fisiológico, para obtenção de cortes no plano coronal em relação às calvárias. Cada fragmento foi lavado com tampão fosfato 0,1 M (3x) por 10 minutos, e submetido a um processo de desidratação em álcool, com concentrações crescentes de 60%, 70%, 80%, 90%, com 10 min cada, e finalmente com álcool 100% (3x), com 10 minutos.

Microscopia eletrônica de varredura

Para a análise da morfologia da superfície, as amostras da vitrocerâmica e dos fragmentos de calvária que recebem implante foram colocadas em fita de carbono dupla face, fixadas em um porta amostra de alumínio e metalizadas em um equipamento da marca Quorum Technologies, modelo Q150R, por pulverização catódica, para deposição de um filme de ouro de cerca de 25 nm sobre a superfície, com uso dos seguintes parâmetros: temperatura ambiente de 25°C, corrente de 20 mA, tensão de 2 kV e tempo de deposição de 120 segundos.

Para obtenção das micrografias, utilizou-se do microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca TESCAN, modelo VEGA 3 LMU, pelo método de elétrons secundários, com distância de trabalho de 15 mm e tensão de aceleração dos elétrons de 10 kV. As micrografias, com diferentes ampliações, foram obtidas em dois diferentes pontos de cada amostra, sendo que nos fragmentos de calvária, as micrografias foram realizadas na porção central de implante, local com presença de vitrocerâmica remanescente. As imagens obtidas foram processadas e analisadas e com auxílio do software livre ImageJ (versão Java 1.7 32-bit) de domínio público, permitindo obter dados sobre a morfologia da microestrutura da vitrocerâmica antes e após sua implantação.

Espectroscopia de raios X por energia dispersiva

A espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDX) foi realizada em um sistema acoplado ao próprio equipamento MEV, utilizado as mesmas amostras empregadas nas micrografias. Empregou-se o potencial de aceleração de elétrons de 10 keV, sendo os raios X característicos detectados para cada amostra em um intervalo entre 0 e 4,5 keV. Cada amostra foi analisada em dois pontos diferentes. Foram obtidas as concentrações aparentes dos elementos, bem como calculadas as médias das porcentagens em peso (Wt%). Para a análise EDX as micrografias foram magnificadas 1.000 vezes,

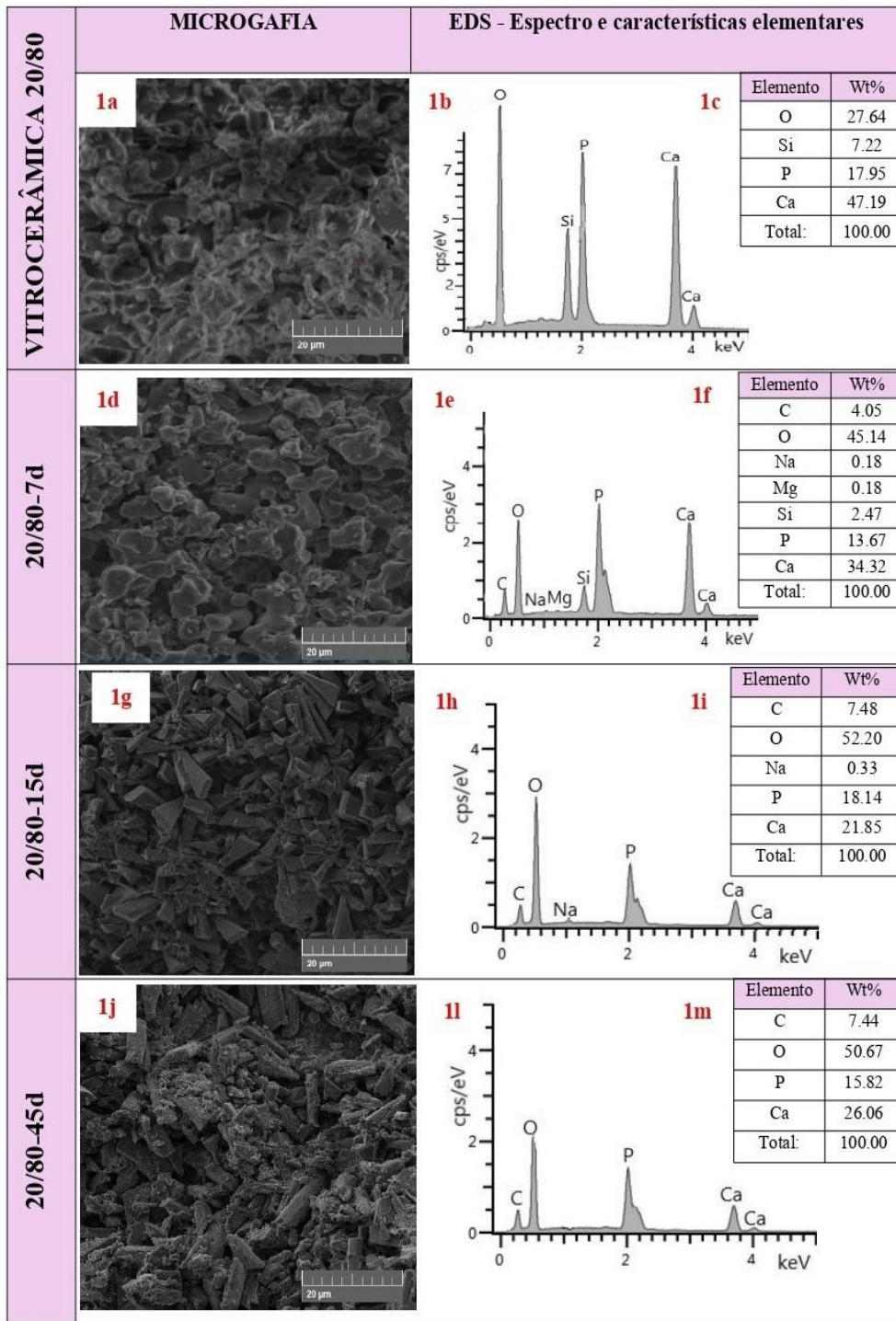
selecionando dois pontos de interesse, cuja a microanálise se baseou na medida dos raios X característicos emitidos da amostra quando bombardeada pelo feixe de elétrons emitido pelo equipamento. A radiação X detectada é específica dos números atômicos dos elementos constituintes da amostra, possibilitando identificação e a quantificação da concentração elementar.

De um modo geral, as micrografias demonstraram que a vitrocerâmica (antes da implantação no modelo experimental) nas proporções (W%/TCP%) 20/80, 60/40 e 80/20, apresentaram morfologia semelhante, com grânulos de formatos variados, superfície composta por partículas irregulares, revelando microestrutura microporosa e interconectada. Na análise ao longo dos pontos biológicos, foi possível observar que os grânulos da vitrocerâmica remanescente estavam integrados no local do implante, com modificações em sua morfologia, indicando diferentes graus de biodegradabilidade.

As micrografias obtidas nos pontos biológicos de 7, 15 e 45 dias demonstram que a vitrocerâmica apresentou diferentes modificações em sua micro estrutura após implantação no modelo experimental, que foi associada à biodegradação. A biodegradabilidade da vitrocerâmica também pode ser associada aos resultados da análise elementar obtida por meio da EDX, cujo os espectros evidenciaram modificações nas intensidades dos picos característicos dos elementos constituintes da vitrocerâmica, O, Ca, P e Si, com importantes variações nas médias das porcentagens em peso (Wt%).

A partir do ponto biológico de 7 dias, é possível identificar que o elemento Si, principal componente da W, apresentou redução em todas amostras analisadas. Já os elementos Ca e P, principais componentes do TCP, podem ser encontrados na vitrocerâmica remanescente até o último ponto biológico analisado (45 dias). As figuras 1, 2 e 3 apresentam, em sequência, as micrografias obtidas por meio da MEV com ampliação de 3.000x, os espectros e quadros com identificação elementar e suas respectivas porcentagens em peso (Wt%), obtidas por meio da EDX.

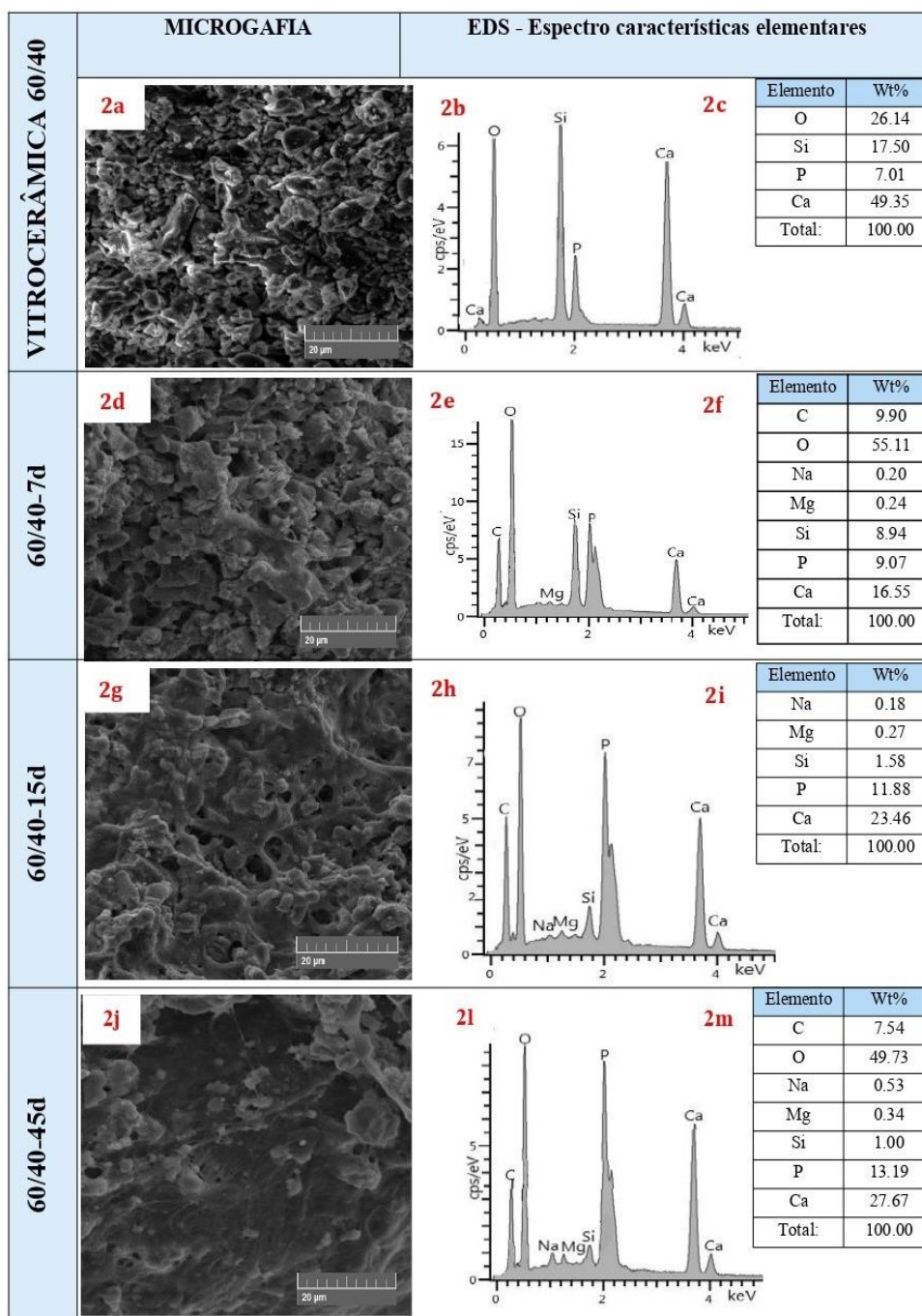
Figura 1 - Resultados das análises da vitrocerâmica 20/80



Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

Nota: Os resultados da vitrocerâmica 20/80 demonstram morfologia com partículas irregulares e subarredondadas (1a), e espectro (1b) confirmando presença dos elementos O, Si, P e Ca, constituintes dos minerais W (CaSiO_3) e TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Observe que as intensidades dos picos no espectro (1b), bem como as médias das porcentagens em peso (Wt%) de cada elemento (1c), confirmam a menor proporção de W (20%) e maior de TCP (80%) na vitrocerâmica 20/80. Ao longos dos pontos biológicos, as micrografias revelam que as partículas da vitrocerâmica se modificam, adquirem aspecto anguloso no ponto biológico de 15 dias (1g) e subangulosa aos 45 dias (1j). Ocorre a rápida diminuição do elemento Si (comparar 1b e 1e).

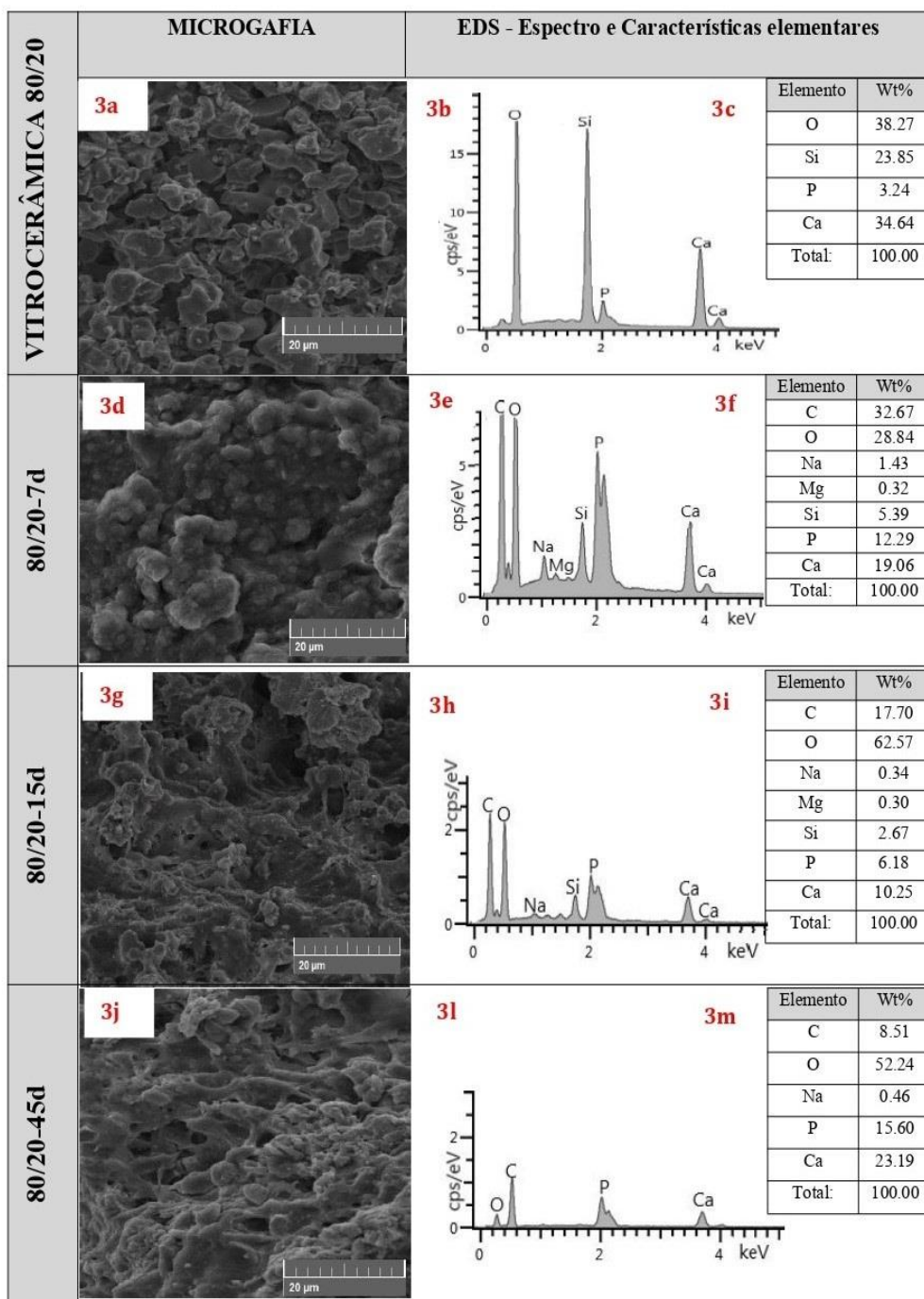
Figura 2 - Resultados das análises da vitrocerâmica 60/40



Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

Nota: Os resultados da vitrocerâmica 60/40 demonstra que as partículas irregulares (2a) adquiriram aparência arredondadas, aumentando visivelmente o tamanho dos poros intragranular (2d e 2g). No entanto, no ponto biológico de 45 dias observa-se presença de poucas e diminutas partículas remanescentes superficiais (2j). Já o espectro (2b) confirma presença dos elementos O, Si, P e Ca, sendo que as intensidades dos picos e as médias das porcentagem em peso Wt% confirmam maior proporção de W (60%) e menor de TCP (40%) na vitrocerâmica 60/40. Ocorre a rápida diminuição do elemento Si (comparar 2b e 2e, e 2c e 2f), no entanto, é observado presença de Si em menor quantidade nos pontos biológicos de 15 e 45 dias (2h, 2l, 2i e 2m). Já a presença dos elementos P e Ca aumentam ao longo dos pontos biológicos, chegando a alcançar uma relação Ca:P (27.67:13.19) próxima de 2:1 (2l e 2m).

Figura 3 - Resultados das análises da vitrocerâmica 80/20



Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

Nota: Os resultados da vitrocerâmica 80/20 também demonstram partículas irregulares (3a) adquiriram aparência arredondadas (3d e 3g), com manutenção dos poros intragranular até ultimo ponto biológico analisado (3j). O espectro (3b) confirma presença dos elementos O, Si, P e Ca, sendo que as intensidades dos picos e as médias das porcentagem em peso Wt% confirmam maior proporção de W (80%) e menor de TCP (20%) na vitrocerâmica 80/20 (3c). Observa-se rápida diminuição do elemento Si (comparar 3b, 3e e 3h), A presença de Si não é mais observada no ponto biológico de 45 dias (3j). Verifica-se nos espectros (3h e 3l) que a intensidade dos picos dos elementos P e Ca diminui consideravelmente.

DISCUSSÃO

As propriedades superficiais e a morfologia de um biomaterial com finalidade de regeneração óssea são determinantes para seu desempenho *in vivo* e interações com as células presentes no microambiente do tecido ósseo (MONTROYA et al., 2021). Dessa forma, com base nas imagens MEV e análise por meio da EDX, confirmou-se que a vitrocerâmica em estudo, com três diferentes proporções de W%/TCP%, apresenta as propriedades de formato, tamanho e morfologia da superfície semelhantes, antes da implantação no modelo experimental. Também, foi confirmada a composição elementar, com presença de O, Si, P e Ca, e diferenças nas médias percentuais em peso de cada elemento (Wt%), que caracterizou as proporções (W%/TCP%) de 20/80, 60/40 e 80/20.

De acordo com imagens MEV e análises EDX, foi possível identificar que as diferentes proporções de W%/TCP% resultaram em diferentes comportamentos de biodegradabilidade da vitrocerâmica após implantação em defeito ósseo crítico em calvária de rato, evidenciado pelas modificações no formato das partículas superficiais e modificações espectrais relacionados à diminuição e/ou ao aumento dos elementos O, Si, P e Ca, ao longo dos pontos biológicos analisados. Sobre a degradabilidade, cabe destacar que a biodegradação do biomaterial em meio fisiológico favorece a regeneração óssea, pois são substituídos gradualmente pelo novo tecido ósseo (GÖTZ *et al.*, 2019). Neste sentido, sabe-se que a W apresenta rápida dissolução inicial, com liberação de ions de Si, associado à hidrólise das ligações Si-O-Si na estrutura do vítrea, que pode estimular o processo de regeneração óssea (SRINATH, ABDUL e VENUGOPAL, 2020; MONÇÃO *et al.*, 2022; LIN *et al.*, 2021).

Em conformidade com a literatura, os resultados do nosso estudo evidenciaram que fase amorfa (vítrea) composta pela W apresentou biodegradabilidade mais rapidamente que a fase cristalizada composta de TCP. Este comportamento que foi observado nas três proporções de W%/TCP% estudadas. A análise EDX demonstrou rápida diminuição na concentração do elemento Si na vitrocerâmica remanescente, logo no primeiro ponto biológico analisado (7 dias), em concordância com resultados de estudos anteriores (ILYAS *et al.*, 2029; MONÇÃO *et al.*, 2022). Ainda, observou-se que nas proporções extremas de 20/80 e 80/20, o elemento Si deixou ser identificado após 7 dias e 15 dias da implantação da vitrocerâmica, respectivamente. Notavelmente, os grânulos remanescentes da vitrocerâmica 20/80 deixarem de apresentar o elemento Si mais precocemente, sendo aqueles que apresentaram modificações na morfologia, cujas as partículas superficiais passaram ser angulosas, de aspecto liso. De acordo com Zhou *et*

al. (2023), a morfologia de um biomaterial com finalidade de regeneração óssea deve imitar a estrutura óssea natural, e apresentar macroporos e microcanais, que são benéficos para a angiogênese e circulação de fluidos e outros componentes, possuir superfície côncava que é benéfica para fixação celular e consequente a formação de tecido ósseo, sendo os microporos benéficos para a adsorção de proteínas. Por isso, entendemos que as modificações morfológicas e elementares que ocorrerem vitrocerâmica 20/80 remanescente indicam que a mesma apresentou características desfavoráveis para regeneração óssea.

Já na vitrocerâmica 60/40, o elemento Si é observado até o último ponto biológico analisado, porém, com importante diminuição na média da sua porcentagem em peso (Wt%), que inicialmente era de 8,94, e aos 45 dias, o remanescente foi de 1,00 Wt%. Este achado indica que a proporção equilibrada na quantidade entre os minerais W e TCP resultou na vitrocerâmica que apresentou biodegradabilidade mais controlada, pois, apesar de não ter impedido a rápida dissolução inicial da W (fase amorfa), ao mesmo tempo permitiu que parte da W permanecesse ao longo dos pontos biológicos. Este resultado indica maior estabilidade química, e pode ser associado à menor redução das propriedades mecânicas da vitrocerâmica (PALADINI e POLLINI, 2022; FERRARIS *et al.*, 2020).

Outrossim, os resultados da análise EDX na vitrocerâmica 60/40 revelaram que os elementos P e Ca aumentaram ao longo dos pontos biológicos, chegando a alcançar aos 45 dias pós implantação a relação Ca:P de 2,09 (Ca = 27,67 Wt% e P = 13,19 Wt%). O estudo de Jingyi, Huijun e Chuanzhong (2018) destacou que biomateriais a base de fosfatos de cálcio com relação Ca:P próximas de 2,0 demonstraram melhor potencial para disseminação celular, proliferação e expressão dos genes da matriz extracelular. Esses autores também destacaram que proporções de Ca:P de até 2,5 podem aumentar a adesão dos osteoblastos no biomaterial, bem como aumentar as interações das células-tronco mesenquimais no local da reparação óssea. Sendo assim, entende-se que a vitrocerâmica 60/40 apresentou características elementares favoráveis para o processo de regeneração óssea.

Finalmente, a vitrocerâmica 80/20, com maior proporção de W, demonstrou resultados que evidenciam maior degradabilidade e reabsorção. Em nosso estudo, foi possível verificar que ao longo dos pontos biológicos analisados, os espectros

apresentaram considerável redução na intensidade dos picos dos elementos Si, P e Ca. De acordo com Ribas *et al.* (2019), os materiais a base de silicato de cálcio, como a W, apresentam taxa de degradação mais rápida que a regeneração do tecido ósseo, assim como apresentam resistência mecânica relativamente baixa, limitando suas aplicações em alguns defeitos ósseos. Em concordância, nossos resultados indicam que a vitrocerâmica 80/20, com maior proporção de W (silicato de cálcio), apresentou rápida biodegradabilidade e alta reabsorção, características que limitam a regeneração óssea.

CONCLUSÃO

A fim de favorecer o processo de regeneração óssea, é crucial que o biomaterial implantado em sítio ósseo apresente biodegradabilidade controlada, acompanhando o processo de formação do novo tecido ósseo. Neste estudo, por meio das análises MEV e EDX, foi possível verificar diferentes modificações na morfologia e na concentração elementar de uma vitrocerâmica implantada em calvária de rato, concluindo que diferentes proporções de W%/TCP% conferiram à vitrocerâmica diferentes comportamentos de biodegradabilidade após implantação em sítio ósseo, com melhor desempenho da vitrocerâmica 60/40.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Instituto de Cerâmica e Vidro de Madri, Espanha; os laboratórios de Caracterização de Materiais (LCM) e de Física Radiológica (LAFIR) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia - IFBA. Agradecimentos especiais à professora Fabiana Pain Rosa pela inspiração para continuidade deste estudo.

REFERÊNCIAS

AYKORA, D.; UZUN, M. Bone tissue engineering for osteointegration: Where are we now?. *Polymer Bulletin*, v. 81, n. 10, p. 1-11, 2024. <https://doi.org/10.1007/s00289-024-05153-9>.

BARBOSA, W.T., *et al.* Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ β -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, v.108, n. 3, p. 1107–1116, 2020. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34462>

DINGLINGGE, C.; JIANDONG, D. Recent advances in regenerative biomaterials. *Regenerative Biomaterials*, v. 9, rbac098, 2022. <https://doi.org/10.1093/rb/rbac098>

FERRARIS, S., *et al.* The mechanical and chemical stability of the interfaces in bioactive materials: The substrate-bioactive surface layer and hydroxyapatite-bioactive surface layer interfaces. *Materials Science and Engineering: C*, v. 116, 111238, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111238>.

GIRÓN, J., *et al.* Biomaterials for bone regeneration: an orthopedic and dentistry overview. *Brazilian journal of medical and biological research*, v.54, n. 9, e11055, 2021. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2021e11055>

SANTOS, G.G., *et al.* Bone regeneration using Wollastonite/ β -TCP scaffolds implants in critical bone defect in rat calvaria. *Biomedical physics & engineering express*, v. 7, n. 5, 10.1088/2057-1976/ac1878, 2021. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/ac1878>

GÖTZ, W., *et al.* Effects of Silicon Compounds on Biomineralization, Osteogenesis, and Hard Tissue Formation. *Pharmaceutics*, v. 11, n. 3, 117, 2019. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030117>

ILYAS, A., *et al.* Rapid Regeneration of Vascularized Bone by Nanofabricated Amorphous Silicon Oxynitrophosphide (SiONP) Overlays. *Journal of biomedical nanotechnology*, v. 15, n. 6, 2019. <https://doi.org/10.1166/jbn.2019.2779>

LIN, Q., *et al.* The in vivo dissolution of tricalcium silicate bone cement. *Journal of biomedical materials research. Part A*, v. 109, n. 12, p. 2527–2535, 2021. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37247>

MINARELLI, A.M.G., *et al.* Biological Response to Wollastonite Doped α -Tricalcium Phosphate Implants in Hard and Soft Tissues in Rats. *Key Engineering Materials*, 396-398, p. 7–10, 2008. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.396-398.7>

MONÇÃO, M., *et al.* Raman Spectroscopy Analysis of Wollastonite/Tricalcium Phosphate Glass-Ceramics after Implantation in Critical Bone Defect in Rats. *Materials Sciences and Applications*, v. 13, p. 317-333, 2022. <https://doi.org/10.4236/msa.2022.135017>.

MONTOYA, C., *et al.* On the road to smart biomaterials for bone research: definitions, concepts, advances, and outlook. *Bone research*, v. 9, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41413-020-00131-z>

PALADINI, F.; POLLINI, M. Novel Approaches and Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Focus on Silk Fibroin. *Materials (Basel, Switzerland)*, v. 15, n. 19, 6952, 2022. <https://doi.org/10.3390/ma15196952>

RIBAS, R., *et al.* Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review. *Ceramics International*, v. 45, n. 17, p. 21051 - 21061, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.07.096>.

SHAO, H., *et al.* 3D Robocasting Magnesium-doped Wollastonite/TCP Bioceramics Scaffolds with Improved Bone Regeneration Capacity in Critical Sized Calvarial Defects. *J. Mater. Chem. B.*, v. 5, 10.1039/C7TB00217C, 2017.

SHAO, R., *et al.* State of the art of bone biomaterials and their interactions with stem cells: Current state and future directions. *Biotechnology journal*, v. 17, n. 4, e2100074, 2022. <https://doi.org/10.1002/biot.202100074>

ZENEBE, C.G. A Review on the Role of Wollastonite Biomaterial in Bone Tissue Engineering. *BioMed research international*, 2022, 4996530. <https://doi.org/10.1155/2022/4996530>

ZHOU, J., *et al.* Study on the influence of scaffold morphology and structure on osteogenic performance. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 11, 1127162, 2023. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1127162>