



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Dissertação de Mestrado

**Síntese e Caracterização de Nanopartículas Densas e Esféricas de Vidro
Bioativo Contendo Íons Cobalto para Potencial Aplicação em Engenharia de
Tecidos Cardíacos**

Autor: Marcelo da Silva Mantini Viana

Orientadora: Prof^ª Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientador: Dr. Breno Rocha Barrioni

Belo Horizonte

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Marcelo da Silva Mantini Viana

Síntese e Caracterização de Nanopartículas Densas e Esféricas de Vidro Bioativo Contendo Íons Cobalto para Potencial Aplicação em Engenharia de Tecidos Cardíacos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientadora: Prof^a Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientador: Dr. Breno Rocha Barrioni

Belo Horizonte

2022

V614s

Viana, Marcelo da Silva Mantini.

Síntese e caracterização de nanopartículas densas e esféricas de vidro bioativo contendo íons cobalto para potencial aplicação em engenharia de tecidos cardíacos [recurso eletrônico] / Marcelo da Silva Mantini Viana. - 2022.

1 recurso online (76 f. : il., color.) : pdf.

Orientadora: Marivalda de Magalhães Pereira.

Coorientador: Breno Rocha Barrioni.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 61-76.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Biomateriais - Teses. 4. Processo sol-gel - Teses. 5. Vidros bioativos - Teses. I. Pereira, Marivalda de Magalhães, 1960-. II. Barrioni, Breno Rocha. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

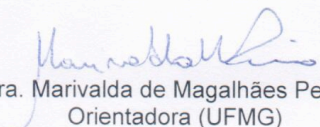
CDU: 620(043)

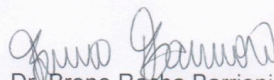


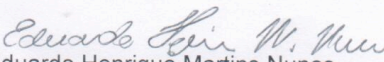
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Metalúrgica, Materiais e de Minas

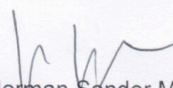


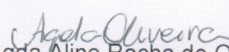
A dissertação intitulada "**Síntese e Caracterização de Nanopartículas Densas e Esféricas de Vidro Bioativo Contendo Íons Cobalto para Potencial Aplicação em Engenharia de Tecidos Cardíacos**", área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais, apresentada pelo candidato **Marcelo da Silva Mantini Viana**, para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, foi aprovada pela comissão examinadora constituída pelos seguintes membros:

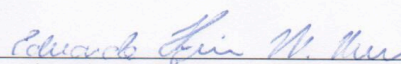

Dra. Marivalda de Magalhães Pereira
Orientadora (UFMG)


Dr. Breno Rocha Barrioni
(Pós-Doc/UFMG)


Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes
(UFMG)


Dr. Herman Sander Mansur
(UFMG)


Dra. Agda Aline Rocha de Oliveira
(JHS)


Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas/UFMG

Belo Horizonte, 20 de junho de 2022

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Gláucia e Hélio, e ao meu irmão e minha cunhada, Rodrigo e Ana, por todo o apoio e incentivo durante toda minha vida. Também gostaria de agradecer aos meus avós e todos os meus tios, tias, primos, primas e meus amigos sempre muito presentes na minha vida e que muito me ajudaram nesse período.

Gostaria de agradecer também à professora Marivalda, por todo o suporte e oportunidades de aprendizado ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também ao Breno, que muito me ensinou, pelo suporte e direcionamentos imprescindíveis para a realização desse trabalho ao longo desses 2 anos.

A todos os companheiros de laboratório, muito obrigado pela companhia, amizade e grande ajuda.

Agradeço também a todos os professores e funcionários do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da UFMG, e ao PPGEM, pelo suporte na execução do trabalho. Agradeço ainda ao Centro de Microscopia da UFMG e ao CEMUCASI pelas análises de microscopia e XPS.

Finalmente, agradeço a FAPEMIG, CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

Doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morte e hospitalizações no mundo atualmente, e devido à baixa capacidade regenerativa natural do músculo cardíaco, as opções de tratamento para casos graves de cardiopatias são bastante limitadas. Portanto, a engenharia de tecidos vem sendo investigada como uma alternativa para o tratamento dessas doenças. A abordagem atual envolve a incorporação de células tronco ou cardiomiócitos a *scaffolds* tridimensionais biocompatíveis capazes de estimular o desenvolvimento celular. No entanto, a vascularização de enxertos artificiais é um desafio. Os vidros bioativos (VB), aplicados extensivamente para regeneração óssea, tem sido atualmente investigados para aplicações em tecidos moles, sendo um dos motivos a sua capacidade de estímulo da vascularização, em especial quando são incorporados à sua estrutura íons com conhecidas propriedades angiogênicas, como íons cobalto (Co). Nesse trabalho, foram sintetizadas nanopartículas de VB no sistema SiO_2/CoO em diferentes composições nominais pelo método de Stöber modificado, e análises químicas confirmaram que cobalto foi incorporado com sucesso ao sistema, com concentração máxima de 11,1% molar. A obtenção de nanopartículas esféricas e densas foi confirmada, com tamanho de partícula entre 63 ± 9 e 66 ± 7 nm, confirmado por microscopia eletrônica de transmissão. A formação de Co_3O_4 depositado como uma segunda fase na superfície das partículas foi observada e confirmada por Difração de Raios-X, e a Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS) indicou que o cobalto também foi incorporado à rede vítrea como Co^{2+} . Apesar de um perfil de liberação rápido de Co em tampão fosfato salino (PBS), as partículas obtidas não se mostraram citotóxicas a células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) em concentrações de até $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Assim, a metodologia sol-gel empregada permitiu a obtenção de nanopartículas esféricas densas de VB contendo cobalto, como um modificador de rede, com potencial para serem empregadas para a engenharia de tecidos cardíacos.

Palavras-chave: biomateriais, tecido cardíaco, vidro bioativo, sol-gel

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the leading causes of death and hospitalization in the world today, and due to the low natural regenerative capacity of the heart muscle, treatment options for severe cases of heart disease are quite limited. Therefore, tissue engineering has been investigated as an alternative treatment for such diseases. The current approach involves the incorporation of stem cells or cardiomyocytes into biocompatible three-dimensional scaffolds capable of stimulating cell development. However, the vascularization of artificial patches is a challenge. Bioactive glasses (BGs), which have been extensively used for bone regeneration, are now being investigated for applications in soft tissues. One of the reasons being their ability to stimulate vascularization, especially when ions with known angiogenic properties are incorporated into their structure, such as cobalt (Co) ions. In this work, VB nanoparticles were synthesized in the SiO_2/CoO system in different nominal compositions by a modified Stöber method, and chemical analysis confirmed that cobalt was successfully incorporated into the system, with a maximum concentration of 11.1% mol. Spherical and dense nanoparticle morphology was confirmed, with particle size ranging from 63 ± 9 to 66 ± 7 nm by transmission electron microscopy. Co_3O_4 formation deposited as a second phase on the particles' surface was observed and confirmed by X-Ray Diffraction, and X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) indicated that cobalt was also incorporated into the glass network as Co^{2+} . Despite a rapid release profile of Co in phosphate-buffered saline (PBS), the obtained particles were not cytotoxic to human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC) at concentrations up to $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Thus, the sol-gel methodology employed proved effective for the obtention of dense spherical BG nanoparticles containing cobalt as a network modifier, with potential applications in cardiac engineering.

Keywords: biomaterials, cardiac tissue, bioactive glass, sol-gel

Lista de Figuras

Figura 3.1: Ilustração esquemática do coração (CHANDIKA <i>et al.</i> , 2020).	18
Figura 3.2: Ilustração esquemática do tecido cardíaco e de seus principais componentes (MONTERO <i>et al.</i> , 2020).	20
Figura 3.3: Reações de hidrólise e condensação do TEOS no processo sol-gel. Adaptado de (RAHMAN; PADAVETTAN, 2012).	28
Figura 4.1: Procedimento experimental	37
Figura 5.1: Imagens das nanopartículas obtida por MET. A e B: VB; C e D: VB05Co; E e F: VB1Co.	47
Figura 5.2: Histograma do diâmetro de partícula para as amostras de VB, VB05Co e VB1Co.	48
Figura 5.3: Isotermas de adsorção de N ₂ das amostras A) VB; B) VB05Co e C) VB1Co.	53
Figura 5.4: Espectros de FTIR obtidos para VB, VB05Co e VB1Co.	54
Figura 5.5: Padrões de difração de raios-X (DRX) das amostras VB, VB05Co e VB1Co e padrão JCPDS 00-001-1152 para Co ₃ O ₄	56
Figura 5.6: Espectros de XPS das amostras de VB, VB05Co e VB1Co.	59
Figura 5.7: Espectro de alta resolução Si 2p das amostras VB, VB05Co e VB1Co	61
Figura 5.8: Espectro de alta resolução O 1s das amostras VB, VB05Co e VB1Co	62
Figura 5.9: Espectro de alta resolução Co 2p das amostras VB05Co e VB1Co ...	63
Figura 5.10: Perfil de liberação de íons Si e Co de VB, VB05Co e VB1Co e amostra controle de PBS	66
Figura 5.11: Viabilidade celular das amostras VB, VB05Co e VB1Co por MTT após 24h, 48h e 72h.	69

Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Razão molar Si:Co para síntese das amostras de Vidro Bioativo	39
Tabela 5.1: Razão molar e composição química (%mol) das amostras de vidro bioativo determinadas pelo método de digestão ácida e por ICP-OES.....	45
Tabela 5.2: Diâmetro Médio das partículas por DLS, MET e valores de Potencial Zeta para as amostras VB, VB05Co e VB1Co.....	50
Tabela 5.3: Propriedades texturais determinados por BET e BJH para as amostras VB, VB05Co e VB1Co.....	53
Tabela 5.4: Bandas de absorvância observadas por FTIR para as amostras de vidro bioativo contendo diferentes teores de cobalto.....	55
Tabela 5.5: Ângulos e planos cristalinos correspondentes para Co_3O_4	57

Lista de Notações

BET	Brunauer-Emmett-Teller
CM	Cardiomiócito
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DRX	Difração de Raio-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
ECM	Matriz Extracelular
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
FBS	Soro fetal bovino
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
HIF-1α	Fator de Indução da Hipóxia
HUVEC	Células endoteliais da veia do cordão umbilical humano
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
PBS	Tampão fosfato-salino
PCL	Policaprolactona
TEOS	Tetraetil Ortosilicato
VB	Vidro Bioativo
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Tecido Cardíaco	17
3.2	Engenharia de Tecidos Cardíacos	21
3.3	Vidro Bioativo	24
3.3.1	Métodos de obtenção de VBs	27
3.3.2	Aplicações biomédicas dos VBs para Engenharia de Tecidos Cardíacos	30
3.3.3	Incorporação de íons terapêuticos em VBs	32
3.3.3.1	VBs contendo Cobalto	34
4.	METODOLOGIA	37
4.1	Materiais	38
4.2	Síntese das partículas nanométricas de Vidro Bioativo contendo Cobalto via rota Sol-Gel	38
4.3	Caracterizações das partículas de VB	39
4.3.1	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)	39
4.3.2	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	40
4.3.3	Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e medição do potencial Zeta (PZ)	40
4.3.4	Adsorção de nitrogênio	41
4.3.5	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	41
4.3.6	Difração de raios-X (DRX)	41

4.3.7	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)	42
4.3.8	Liberação de íons Co^{2+}	42
4.3.9	Análise de viabilidade celular por MTT	42
5.	RESULTADOS	44
5.1	Composição química	44
5.2	Análises morfológicas e texturais	46
5.2.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	46
5.2.2	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (PZ)	50
5.2.3	Adsorção de nitrogênio	51
5.3	Caracterização estrutural	54
5.3.1	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	54
5.3.2	Difração de Raios-X (DRX)	56
5.3.3	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)	58
5.4	Liberação Iônica em PBS	65
5.5	Análise de viabilidade celular por MTT	68
6.	CONCLUSÕES	70
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	71
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares são umas das principais causas de hospitalizações e mortes no mundo, levando ao óbito milhões de pessoas todos os anos e resultando em custos elevados para os sistemas de saúde de diversos países. Dentre as cardiopatias, destaca-se a doença arterial coronariana, um subgrupo de enfermidades que advém da restrição do fluxo sanguíneo ao músculo cardíaco. Esse fluxo diminuído de sangue pode ocasionar na morte de parte do tecido cardíaco, comprometendo o funcionamento adequado do coração (MONTERO *et al.*, 2020).

Como o tecido cardíaco apresenta baixa capacidade regenerativa, a principal forma de tratamento atualmente empregada para cardiopatias graves, em que há significativa perda de função do músculo cardíaco, é o transplante de órgãos (CHANDIKA *et al.*, 2020). Apesar de os transplantes terem sido um grande avanço médico-científico, existem uma série de fatores como a escassez de doadores, a possibilidade de rejeição de órgãos implantados e a dificuldade técnica dos procedimentos que suscitam a busca por tratamentos alternativos. Nesse sentido, a engenharia de tecidos tem sido investigada como uma possibilidade para o tratamento dessas doenças (MONTERO *et al.*, 2020).

A engenharia de tecidos envolve uma abordagem multidisciplinar para auxiliar na regeneração e no eventual reparo dos tecidos danificados a partir da combinação de células tronco ou compostos bioativos terapêuticos com biomateriais arranjados em estruturas tridimensionais que sejam similares ao tecido nativo (NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011). Para a engenharia de tecidos cardíacos, foram inicialmente explorados tratamentos envolvendo apenas a injeção de células tronco, mas análises experimentais e testes clínicos mostraram que essa abordagem apresentava limitações importantes na regeneração do tecido danificado. O foco dos estudos na área de engenharia de tecidos cardíacos tem se voltado então nos últimos anos para o desenvolvimento de enxertos cardíacos a partir de componentes terapêuticos e de *scaffolds* que atuam como substratos. Além disso,

o escopo da área de engenharia de tecidos cardíacos tem se expandido além da busca por tratamentos regenerativos, para a modelagem de doenças e para a testagem de medicamentos, por exemplo (HUYER *et al.*, 2015; MEI, XUAN; CHENG, 2020).

Diversos biomateriais sintéticos e de origem natural são usados para a produção de *scaffolds* para engenharia de tecidos cardíacos. Dentre os materiais de origem natural podem ser citados a quitosana e o colágeno. Polímeros sintéticos já empregados para esse fim incluem a policaprolactona (PCL), poliésteres, poliuretanos e o álcool polivinílico (PVA) (AHADIAN *et al.*, 2017; DATTOLA *et al.*, 2019; POK *et al.*, 2013). Esses *scaffolds* para tecidos cardíacos devem apresentar diversas propriedades estruturais e funcionais similares ao tecido nativo para serem adequados para a diferenciação e proliferação de células cardíacas. No entanto, um dos grandes problemas enfrentados na área é a falta de vasos sanguíneos funcionais, que leva a uma baixa taxa de sobrevivência das células implantadas. (BARABADI *et al.*, 2016; KARGOZAR *et al.*, 2018). Assim, torna-se necessário incorporar aos *scaffolds* componentes que sejam capazes de promover a angiogênese. Bons candidatos para essa finalidade são os vidros bioativos (VB) (BARABADI *et al.*, 2016; MADDEN *et al.*, 2010).

O vidro bioativo foi desenvolvido por Larry Hench e colaboradores em 1969 e amplamente estudado nos anos seguintes pela sua alta biocompatibilidade e bioatividade. Inicialmente produzido por Hench via rotas de fusão na composição 45S5 (45% SiO₂, 24,5% CaO, 24,5% Na₂O e 6% P₂O₅, % em peso), os vidros bioativos também podem ser obtidos por rotas químicas, como o método sol-gel, que permitiram a obtenção de novas composições de vidros bioativos com diferentes características morfológicas, como porosidade e tamanho de partículas variados (KARGOZAR; HAMZEHLU; BAINO, 2017). Dentre as morfologias mais estudadas, as nanopartículas se destacam pela sua elevada área superficial e maior facilidade de incorporação homogênea em matrizes poliméricas, se comparadas às partículas micrométricas. Nas últimas décadas, os vidros bioativos foram

investigados e se estabeleceram como um material usual para a engenharia de tecidos ósseos. Mais recentemente, no entanto, passou-se a explorar o potencial desse material cerâmico também na engenharia de tecidos moles, como tecidos cardíacos e pulmonares, integrando-o à *scaffolds* poliméricos, devido a sua capacidade de promover a adesão celular e a angiogênese (KARGOZAR; HAMZEHLU; BAINO, 2017; MIGUEZ-PACHECO; HENCH; BOCCACCINI, 2015).

As propriedades dos vidros bioativos são, em grande parte, atribuídas à elevada reatividade superficial dessa classe de materiais, que resulta na liberação de íons solúveis, como Si e Ca, que induzem respostas fisiológicas positivas. A degradação controlada desse material permite ainda a liberação contínua desses íons. Além disso, é possível incorporar à estrutura do vidro diferentes íons, como o cobalto, manganês, cobre ou prata que, quando liberados em sua forma iônica no meio corporal, promovem efeitos terapêuticos específicos de forma continuada (BARRIONI, BRENO ROCHA; DE OLIVEIRA; DE MAGALHÃES PEREIRA, 2016). Nesse sentido, o cobalto se destaca por sua capacidade de induzir a angiogênese através da estabilização do fator de indução da hipóxia (HIF-1 α), e como consequência promove a neovascularização, favorecendo o crescimento *in vivo* de tecidos (BARRIONI, BRENO ROCHA; DE OLIVEIRA; DE MAGALHÃES PEREIRA, 2016; MOURA *et al.*, 2017). No entanto, a mineralização tipicamente associada a vidros bioativos não é desejada para aplicações em tecidos moles, como o tecido cardíaco. Embora ainda não existam estudos definitivos sobre o assunto, é possível que composições binárias contendo apenas sílica e o íon metálico desejado diminuam o risco de calcificação de tecidos moles (KARGOZAR *et al.*, 2018; KARGOZAR; HAMZEHLU; BAINO, 2017). Além disso, partículas de composição binária permitem o estudo da incorporação do íon metálico sem a influência dos demais componentes.

Tendo em vista as informações acima, o presente trabalho visa a obtenção e caracterização de nanopartículas esféricas de vidro bioativo contendo cobalto, um potencial íon terapêutico com propriedades angiogênicas, obtidas a partir da rota

sol-gel, para a possível aplicação em engenharia de tecidos cardíacos. Vale destacar que até o momento, não é do nosso conhecimento a obtenção de partículas nanométricas esféricas no sistema $\text{SiO}_2\text{-CoO}$, produzidas via rota sol-gel para possível aplicação na engenharia de tecidos cardíacos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir nanopartículas densas de vidro bioativo contendo cobalto e avaliar suas propriedades estruturais e físico-químicas para possível aplicação na engenharia de tecidos cardíacos.

2.2 Objetivos Específicos

- Síntese e caracterização de partículas nanométricas densas de VB em diferentes composições nos sistemas SiO_2/CoO pelo método sol-gel.
- Avaliar a composição química das nanopartículas obtidas por espectroscopia de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).
- Avaliar a morfologia, o tamanho de partícula e as propriedades texturais das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta (PZ) e BET.
- Avaliar a estrutura química das nanopartículas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS).
- Avaliar a liberação de íons em PBS pelas nanopartículas ao longo de um período de 14 dias.
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas obtidas por MTT.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tecido Cardíaco

O coração é o órgão responsável pelo bombeamento contínuo e unidirecional de sangue que garante a circulação de oxigênio e nutrientes ao longo do sistema cardiovascular a um custo elevado de energia (MONTERO *et al.*, 2020). É o primeiro órgão a ser formado, após apenas três semanas de gestação em seres humanos, e funciona ininterruptamente até o fim da vida. Ao longo da vida, as válvulas cardíacas se abrem e se fecham, em média, três bilhões de vezes, o que representa uma média diária de cem mil movimentos (BRAND, 2003; MISFELD; SIEVERS, 2007).

O funcionamento adequado do órgão é obtido a partir de uma arquitetura tridimensional bastante especializada e de uma composição variada de células e fases acelulares. A macroestrutura do coração é caracterizada por quatro cavidades interligadas por válvulas que impedem o refluxo, conforme ilustrado na Figura 3.1. Os dois átrios recebem o sangue do corpo e dos pulmões a partir das veias cavas inferior e superior e das veias pulmonares e, ao se contraírem, movimentam o sangue para os ventrículos. Os ventrículos, por sua vez, se contraem e bombeiam o sangue para os pulmões e para o restante do corpo. O ventrículo esquerdo, responsável pelo bombeamento para o corpo, é notadamente maior e apresenta paredes musculares mais espessas (CHANDIKA *et al.*, 2020; MONTERO *et al.*, 2020).

A formação do coração envolve uma série de eventos moleculares, celulares e morfológicos. A maioria das células progenitoras tem sua origem na mesoderme, e sob a atuação de diversos sinalizadores e moduladores moleculares se diferenciam em cardiomiócitos (CM), as células do músculo cardíaco, e também em células endoteliais, células vasculares e fibroblastos, que juntos compõem a estrutura cardíaca (MEILHAC *et al.*, 2014). O desenvolvimento do coração continua após a

fase embrionária, e há diferenças marcantes entre CMs adultos e fetais. CMs adultos são maiores e possuem um formato mais regular, além de utilizarem ácidos graxos como fonte energética. CMs fetais apresentam uma forma irregular, tamanhos menores e metabolizam glicose, uma fonte menos eficiente de energia. Por esses motivos, CMs fetais apresentam ainda uma capacidade de contração menor e não são capazes de exercer tensões mecânicas tão elevadas quanto CMs adultos. Esse é um aspecto importante para a engenharia de tecidos cardíacos, visto que os esforços para produzir esses tecidos em laboratório devem levar em conta medidas para promover a maturação dos CMs fetais em CMs adultos (KARBASSI *et al.*, 2020; MEILHAC *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2008).

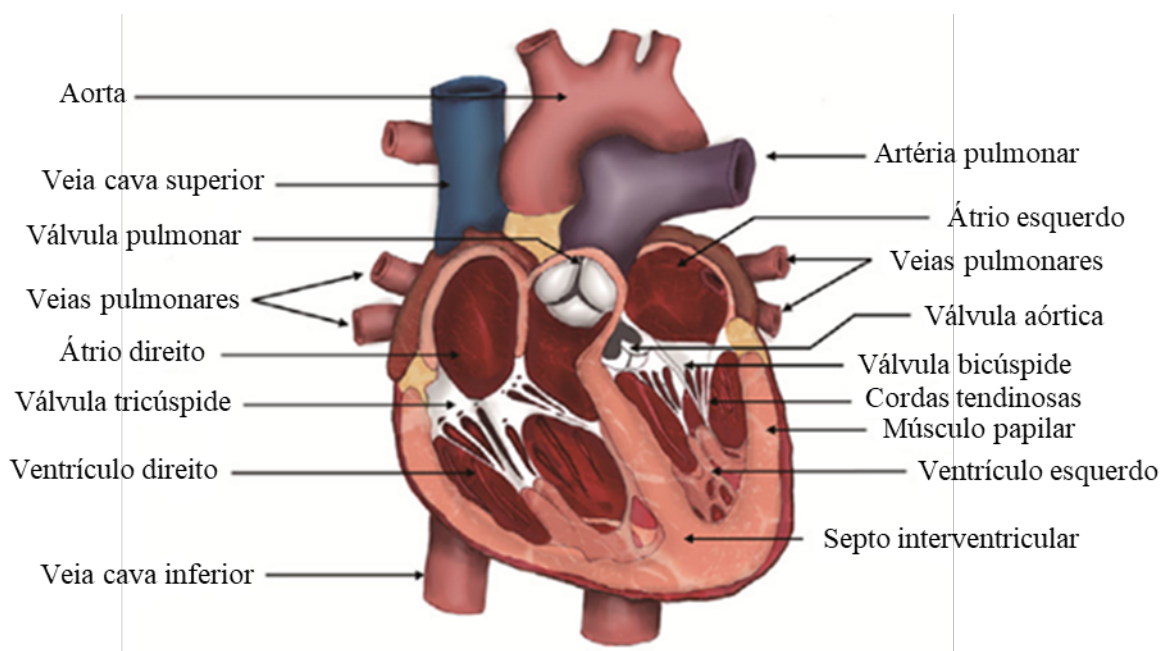


Figura 3.1: Ilustração esquemática do coração (CHANDIKA *et al.*, 2020).

Os cardiomiócitos adultos são alongados, ramificados e tem formato cilíndrico, com diâmetro médio entre 10 e 20 μm e comprimento entre 50 e 100 μm (KOCICA *et al.*, 2007). Eles têm a capacidade única de se contraírem sem a interferência de células nervosas, permitindo o bombeamento sanguíneo, e constituem a maior parte do volume do músculo cardíaco. Embora isso seja um consenso, a fração

numérica das células que compõem o tecido cardíaco é mais incerta. A composição celular do coração não se restringe a CMs, e alguns estudos relatam uma fração numérica maior de CMs em relação aos fibroblastos e células endoteliais, que também compõem o tecido. Outros estudos atribuem uma fração maior às células endoteliais em relação a CMs (CHAUDHURI *et al.*, 2017; MONTERO *et al.*, 2020).

Células endoteliais e fibroblastos desempenham um papel fundamental para o funcionamento do tecido cardíaco. Além de serem responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e oxigênio, as células endoteliais permitem a remodelagem do tecido, caso este sofra algum dano. No entanto, como os CMs adultos são células totalmente diferenciadas, a regeneração do tecido nativo não é possível, e essa remodelagem acompanha algum grau de perda de função. Já os fibroblastos, além de auxiliarem na maturação celular, mantém a matriz extracelular cardíaca (ECM) através de um equilíbrio de degradação e deposição (LI *et al.*, 2009; MONTERO *et al.*, 2020).

As células não estão sozinhas nos tecidos. Na verdade, elas se arranjam ao longo de uma matriz glicoproteica que fornece uma estrutura e ancoragem às células do tecido. No tecido cardíaco, essa matriz extracelular é composta primariamente por colágeno, predominantemente do tipo I (80%) e do tipo III (11%), que corresponde a cerca de 5% da massa total do coração (EGHBALI; WEBER, 1990). Outro componente fundamental da ECM são as fibras elásticas. Essas fibras apresentam um núcleo de elastina, cercado por microfibrilas, que conferem propriedades elásticas ao tecido cardíaco. Elas garantem que o tecido seja capaz de se distender sob tensão e de retornar às dimensões originais uma vez que a carga é removida (LONG; TRANQUILLO, 2003). A ECM desempenha, portanto, um papel fundamental, não só como um elemento estrutural passivo, mas também como um importante sinalizador e determinador de funcionalidade celular. No tecido cardíaco, ela transmite as contrações dos cardiomiócitos, e é observado um comportamento dinâmico da ECM, que se modifica ao longo do desenvolvimento e também em caso de patologias. Nesse último caso, constata-se alterações na ECM

em caso de doenças, mas alterações na ECM também podem levar à defasagem na função cardíaca, que resulta em uma condição patológica. A Figura 3.2 ilustra esquematicamente como os principais componentes celulares e acelulares se organizam para formar o tecido cardíaco (CHANDIKA *et al.*, 2020; MONTERO *et al.*, 2020).

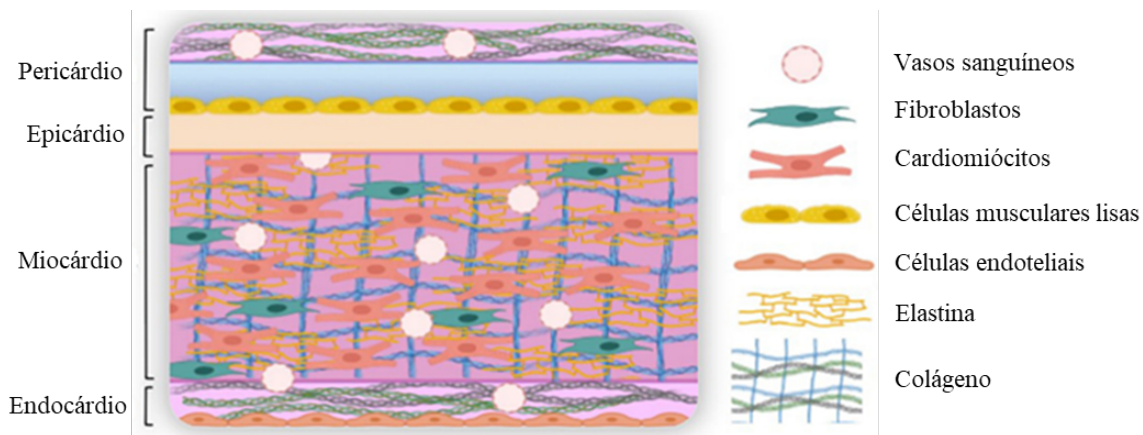


Figura 3.2: Ilustração esquemática do tecido cardíaco e de seus principais componentes (MONTERO *et al.*, 2020).

Embora a composição, a forma como os componentes celulares e acelulares se organizam microscopicamente no tecido cardíaco, e o funcionamento global do coração sejam bem conhecidos, ainda há lacunas no entendimento sobre a arquitetura cardíaca. Ainda não está claro, por exemplo, como as diferentes estruturas interagem entre si para produzir o comportamento global. Não se sabe também se os cardiomiócitos são a unidade funcional básica do tecido cardíaco ou se essas unidades básicas são, na verdade, conjuntos de CMs. Ou ainda como os diferentes tipos de movimento apresentados pelos CMs, em diferentes direções se combinam, de forma a permitir a contração global observada macroscopicamente. Sabe-se, porém, que a orientação de CMs depende da posição no órgão, e que essa orientação está relacionada com a direção da tensão produzida. Além disso, CMs estão sempre próximos aos capilares, à distâncias de cerca de 20 μm , devido à alta demanda energética dessas células (MONTERO *et al.*, 2020).

A combinação dessas características resulta em um tecido de propriedades complexas. O coração apresenta propriedades mecânicas que variam não somente com a orientação, mas também com o estado de contração. No início da diástole, foram medidos valores de rigidez entre 10 e 20 kPa para o ventrículo esquerdo. Já no fim da diástole, esses valores variam entre 200 e 500 kPa (CHEN, QI ZHI *et al.*, 2008).

Outro aspecto importante do tecido cardíaco é a constante atividade elétrica, essencial para a contração e relaxamento das células musculares cardíacas. Como o bombeamento do sangue depende da contração coordenada de bilhões de células cardíacas, a transmissão de sinais elétricos entre essas células é de suma importância. O sinal elétrico no coração se inicia no nó sino atrial, localizado acima do átrio direito. As células dessa região são CMs especializados, denominados células marca passo, capazes de se polarizarem eletricamente sem estímulos externos. As células musculares são conectadas por proteínas que possibilitam um fluxo de íons, permitindo assim a condução elétrica através de células vizinhas. Além disso, existem barreiras isolantes entre os átrios e ventrículos, que diminuem a velocidade de transmissão do impulso elétrico, o que garante a contração escalonada das cavidades cardíacas (SUNDNES *et al.*, 2007).

3.2 Engenharia de Tecidos Cardíacos

Doenças cardíacas são uma das principais causas de morte no mundo, atingindo milhões de pessoas todos os anos. Conforme já discutido, o coração apresenta uma baixa capacidade regenerativa. Doenças que bloqueiam o fluxo sanguíneo para o coração provocam a morte de parte do tecido cardíaco, o que é conhecido como infarto do miocárdio. Os cardiomiócitos adultos não são capazes de se replicar e o número de células tronco cardíacas produzidas não é suficiente para reparar o músculo cardíaco perdido. Como consequência, esse tecido é substituído por tecido cicatricial fibroso que não apresenta propriedades contrácteis.

O conseqüente enrijecimento da área afetada provoca perda da função cardíaca, associada a uma menor capacidade de bombeamento sanguíneo, o que pode resultar em doenças crônicas com um prognóstico desfavorável (HIRT; HANSEN; ESCHENHAGEN, 2014; TENDERA, 2006). Um dos tratamentos propostos para indivíduos com perda de função cardíaca significativa é o transplante de órgãos. Essa é, no entanto, uma alternativa desafiadora e envolve uma série de dificuldades éticas e práticas, sendo a principal delas a escassez de doadores (FEINER; SHAPIRA; DVIR, 2019).

Motivado por esse cenário, o campo de medicina regenerativa tem se desenvolvido cada vez mais. A partir dos anos 2000, o avanço das pesquisas com células tronco trouxe esperanças de que terapias celulares, envolvendo a injeção de células tronco em regiões comprometidas do coração, seriam a chave para desenvolver novas formas de reparar o tecido cardíaco danificado. O avanço nessa área foi rápido e testes clínicos foram desenvolvidos para avaliar a eficácia dessa modalidade de tratamento para a insuficiência cardíaca. Esses testes clínicos estabeleceram a segurança e a viabilidade das terapias celulares, mas não foram observadas melhoras clínicas significativas nos pacientes tratados (BEHFAR *et al.*, 2014). A baixa eficiência desses tratamentos foi atribuída principalmente à alta taxa de morte celular, à baixa taxa de adesão celular e à inabilidade das células injetadas de recriar a estrutura nativa do coração, mesmo quando a diferenciação em CMs foi bem sucedida (CHANDIKA *et al.*, 2020).

Embora as terapias celulares não tenham atingido os resultados inicialmente propostos, o conhecimento adquirido por meio dessas tentativas mostrou que sem um substrato adequado, a regeneração do tecido cardíaco não seria atingida de forma satisfatória. A engenharia de tecidos cardíacos é, então, uma área de atuação multidisciplinar, que tem como objetivo reunir células com capacidade apropriada de diferenciação com *scaffolds* biocompatíveis para obter-se, *in vitro*, tecidos vivos, capazes de serem implantados e promoverem a regeneração no corpo humano. Outra aplicação promissora é a utilização desses tecidos produzidos em laboratório

para melhorar o processo de testagem de drogas na avaliação de toxicidade e eficácia em humanos (MONTERO *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2014). Esses *scaffolds* devem, portanto, apresentar propriedades compatíveis com o tecido nativo, visto que um material com propriedades similares às do tecido cardíaco tem mais chances de ser um substrato adequado para formação de tecido. Para isso, é necessário que o material apresente propriedades mecânicas adequadas: a rigidez deve ser similar à do tecido nativo, assim como a capacidade de sofrer deformações cíclicas sem se deformar plasticamente. O material deve ainda apresentar porosidade elevada, de forma a permitir a ancoragem das células tronco, a sua proliferação e diferenciação. A distribuição do tamanho de poros deve levar em conta ainda diferentes necessidades: poros menores que 50 μm , de tamanho similar à das células possibilitam uma ancoragem eficiente. Poros intermediários, de cerca de 100 μm são necessários para permitir o crescimento celular. Poros maiores que 200 μm e interconectados permitem, por sua vez, a vascularização do tecido e o transporte de nutrientes. Outra característica importante é a hidrofiliabilidade, relacionada à adesão celular, e a capacidade de absorver água. A manutenção de água na estrutura é importante para a difusão de moléculas solúveis e para manter o estado de hidratação adequado para sobrevivência do tecido (BRUŽAUSKAITĖ *et al.*, 2016; CHANDIKA *et al.*, 2020; DATTOLA *et al.*, 2019; POK *et al.*, 2013). Finalmente, para garantir a manutenção do tecido produzido é essencial a vascularização rápida, eficiente e que permita a integração com o tecido nativo (OGLE *et al.*, 2016; SAYED *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2014). Tendo em vista os requerimentos discutidos acima, a seleção adequada das células, dos materiais e das rotas de processamento são essenciais para se obter um enxerto cardíaco bem sucedido. Tang *et al.* (2018) produziu, por exemplo, um *scaffold* de PVA para implantação de células estromais cardíacas em um coração danificado, que se mantiveram ativas após o implante, sendo observado melhora na função cardíaca. POK *et al.*, (2013) sintetizou *scaffolds* de PCL, recobertos por hidrogéis de gelatina e colágeno para diferenciação e maturação de cardiomiócitos a partir de células tronco pluripotentes, obtendo ao fim células pulsantes.

Devido à complexidade do tecido cardíaco e à necessidade de se obter *scaffolds* com características semelhantes à do tecido nativo, a integração de diferentes materiais, capazes de conferir propriedades importantes ao produto final, tem sido o foco da engenharia de tecidos (CHANDIKA *et al.*, 2020). Para a engenharia de tecido cardíacos, algumas dessas propriedades são a condutividade elétrica, a capacidade de promover a vascularização rápida e eficiente ou a capacidade de suportar ciclos de tensão continuamente (MONTERO *et al.*, 2020). A vascularização dos *scaffolds* é particularmente importante, dado que a viabilidade dos implantes é significativamente reduzida na ausência de vasos sanguíneos funcionais (MONTGOMERY; ZHANG; RADISIC, 2014). DVIR *et al.*, (2009) mostrou que enxertos cardíacos pré-vascularizados, construídos a partir de *scaffolds* de alginato se mostraram mais eficazes na integração com o tecido nativo e na melhora da função cardíaca.

Para esse fim, vidros bioativos vêm sendo investigados para a obtenção de compósitos para engenharia de tecido cardíaco. Integrando-os à *scaffolds* poliméricos, obteve-se melhorias na promoção da adesão celular e da angiogênese e da biocompatibilidade após a implantação de células tronco (BARABADI *et al.*, 2016; CHEN, QIZHI *et al.*, 2010). Há o receio, porém de que a incorporação de vidros de composições tradicionais, como a 45S5, possam induzir uma calcificação indesejada do tecido cardíaco (KARGOZAR *et al.*, 2020).

3.3 Vidro Bioativo

Biomateriais capazes de regenerar, reparar ou substituir partes do corpo humano são vitais na medicina moderna. Biocerâmicas como a hidroxiapatita, a alumina ou o vidro bioativo tem sido amplamente explorados (CORMACK; TILOCCA, 2012). O vidro bioativo em particular é uma classe de materiais cerâmicos desenvolvidos por Larry Hench no início dos anos 1970 que se destacou não somente pela sua biocompatibilidade, mas também por sua capacidade de

induzir uma resposta biológica positiva na interface com o tecido nativo. O material inicialmente obtido por Hench apresentava composição molar de 46,1% SiO_2 , 26,9% CaO , 2,6% P_2O_5 e 24,4% Na_2O , posteriormente denominado 45S5 e patenteado como Bioglass[®] (HENCH, L. L. *et al.*, 1971; HENCH, LARRY L., 2006). Suas investigações e estudos subsequentes mostraram que era observada a formação de cristais de hidroxiapatita na superfície do vidro, quando imerso em soluções de fluido corporal simulado. Além disso, constatou-se que devido à essa elevada reatividade em ambientes fisiológicos, o vidro bioativo se ligava fortemente a tecidos ósseos (JONES, 2015).

A descoberta de Hench estimulou o desenvolvimento do campo de estudo das biocerâmicas, com um foco especial no vidro bioativo. Nos últimos 40 anos, pesquisas na área demonstraram a eficácia desse material para regeneração e reparação óssea e dental, e se traduziram em aplicações clínicas comerciais. As utilizações clássicas incluem recobrimentos em implantes ortopédicos, obturações dentárias e pequenos implantes ósseos (MIGUEZ-PACHECO; HENCH; BOCCACCINI, 2015). Nos últimos anos, no entanto, após seguidos avanços nos métodos de obtenção e de controle da composição e das propriedades dos VBs, tem-se proposto a sua aplicação também na engenharia de tecidos moles. Esses campos emergentes de estudo incluem a regeneração neuronal, implantes epiteliais, desenvolvimento de córnea artificial, regeneração do tecido pulmonar, desenvolvimento de curativos para feridas cutâneas e regeneração do tecido cardíaco (KARGOZAR *et al.*, 2020; KARGOZAR; HAMZEHLU; BAINO, 2017; MIGUEZ-PACHECO; HENCH; BOCCACCINI, 2015).

VBs são compostos cerâmicos amorfos e sua estrutura é formada por compostos formadores de rede, compostos intermediários e compostos modificadores de rede. Os compostos formadores de rede são aqueles capazes de formar a estrutura vítrea sem a adição de qualquer outro componente. Os principais formadores de rede para obtenção de VBs são a sílica (SiO_2), o pentóxido de sódio (P_2O_5) e trióxido de boro (B_2O_3). VBs cujo principal formador de rede é sílica são os

mais utilizados atualmente. A unidade básica estrutural desses vidros silicatos é o SiO_4 , que assume uma geometria tetraédrica que se conecta a outras unidades básicas por meio de ligações Si-O-Si. Os compostos modificadores de rede, como o sódio, se ligam na forma de cátions a átomos de oxigênio, provocando a perturbação da rede vítrea ao converter oxigênio ligantes em oxigênios não ligantes e alterando propriedades, como a temperatura de fusão. A composição do vidro está intimamente ligada a suas propriedades, assim como suas características morfológicas, tais qual tamanho de partícula e a porosidade (BRAUER, 2015).

Os VBs podem ser utilizados isoladamente ou em compósitos, associados a matrizes poliméricas ou como revestimento para materiais metálicos. Além disso, podem ser produzidos em diversos formatos: pós, *scaffolds*, fibras ou nanopartículas (IZQUIERDO-BARBA; SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013). A capacidade de incorporação de fármacos e íons terapêuticos na estrutura do vidro é de particular interesse, uma vez que permite a liberação controlada desses componentes, induzindo respostas biológicas compatíveis com as necessidades do tecido tratado (KARGOZAR *et al.*, 2018).

Nanopartículas de VB são particularmente atrativas para uma série de aplicações biomédicas. O tamanho diminuto, bem como uma área superficial elevada e uma razão elevada entre volume e área tornam as nanopartículas mais apropriadas para a liberação controlada de fármacos ou íons terapêuticos e para a construção de compósitos quando comparadas a partículas de tamanho micrométrico. Particularmente para essa última finalidade, a superioridade das características morfológicas das nanopartículas é evidente, sendo a incorporação homogênea em matrizes poliméricas bastante facilitada (BOCCACCINI *et al.*, 2010; EROL-TAYGUN; ZHENG; BOCCACCINI, 2013).

3.3.1 Métodos de obtenção de VBs

O vidro bioativo pode ser produzido a partir de rotas de processamento distintas. A metodologia mais tradicional, por fusão, empregada inicialmente por Hench, e utilizada até hoje na produção de VBs comerciais, consiste na mistura dos óxidos precursores do vidro e no seu posterior aquecimento a temperaturas superiores a 1300 °C. Em geral, são adicionados óxidos modificadores de rede como o Na₂O, que atuam como fundentes, diminuindo a temperatura de fusão do material e melhorando sua processabilidade. Em seguida, a mistura fundida é rapidamente resfriada, de forma a prevenir a cristalização e resultando na obtenção do vidro com a composição desejada (JONES, 2015). Apesar do seu uso disseminado, o controle fino das propriedades do material final não é trivial. Outras desvantagens desse método de produção são a obtenção de partículas com formatos irregulares e distribuição de tamanho pouco homogêneas. Além disso, o custo energético é elevado, uma vez que a fusão dos óxidos precursores só acontece em altas temperaturas (LUKOWIAK *et al.*, 2013).

Atualmente, o foco tem se voltado para a obtenção de VBs pelo método sol-gel, que se dá em temperatura ambiente e que permite um controle maior do tamanho e da morfologia das partículas formadas, bem como de sua pureza. Essa rota também permite a obtenção de vidros com concentração de sílica de até 100% e que ainda apresentam bioatividade significativa, superando uma limitação do método de fusão tradicional (PINNA *et al.*, 2021; ROMÁN; PADILLA; VALLET-REGÍ, 2003). O processo sol-gel consiste em reações de hidrólise, condensação e gelificação de precursores, seguidos por etapas de secagem e estabilização. O controle dos parâmetros reacionais, como pH, a concentração dos reagentes e precursores, os catalisadores e o solvente utilizado, permite o controle das propriedades do material final, como sua morfologia e composição, com grande precisão (HENCH, LARRY L; WEST, 1990).

O método sol gel envolve a transformação de um sol, uma suspensão coloidal de partículas nanométricas, em um gel, uma rede integrada de partículas discretas

ou de agregados de partículas. O processo se inicia com a preparação do sol a partir de precursores organometálicos. Para a síntese de VBs baseados em silicatos, os precursores mais comuns são os alcóxidos metálicos como o tetraetil ortossilicato (TEOS) e o tetrametil ortossilicato (TMOS). Esses precursores são inicialmente hidrolisados resultando na formação de grupos silano (Si-OH). Esses grupos silano presentes em moléculas hidrolisadas reagem entre si, formando ligações siloxano (Si-O-Si). A medida em que as reações de condensação se desenvolvem a estrutura tridimensional do gel é formada, com liberação de água ou álcool. As reações de hidrólise e de condensação estão esquematizadas na Figura 3.9. Ao fim do processo de gelificação, o material deve passar por um processo de secagem para remover os líquidos solventes e formados ao longo do processo dos poros do gel. Em seguida, o gel seco é submetido a um tratamento térmico a temperaturas mais elevadas, entre 600°C e 800°C, em que os grupos silanóis são removidos da superfície, resultando em um material quimicamente estável. Além disso, em temperaturas elevadas, observa-se também a densificação do material, resultando em maior estabilidade mecânica (RAHMAN; PADAVETTAN, 2012; VICHERY; NEDELEC, 2016).

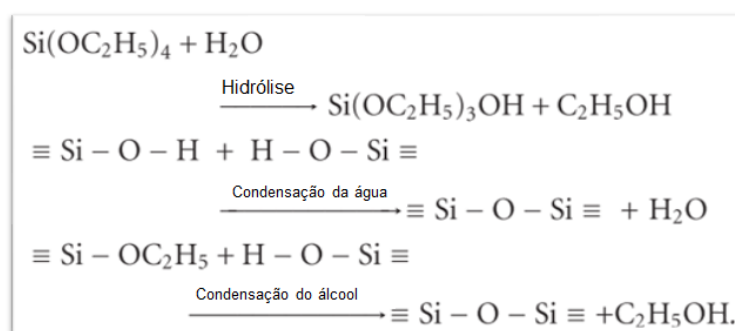


Figura 3.3: Reações de hidrólise e condensação do TEOS no processo sol-gel. Adaptado de (RAHMAN; PADAVETTAN, 2012)

O pH do meio em que a síntese ocorre tem um papel fundamental no controle do processo de polimerização observado, o que implica em propriedades

morfológicas diferentes do produto final. Para valores de pH menores que 2, o processo de gelificação é bastante lento e a formação e agregação das partículas acontece ao mesmo tempo. Para esses valores de pH, as partículas que se agregam e formam a estrutura do gel são muito pequenas, de cerca de 2nm. Para valores de pH entre 2 e 7, a condensação acontece preferencialmente entre partículas mais condensadas e menos condensadas, de forma que a dimerização demora a acontecer. No entanto, uma vez formados, esses dímeros reagem preferencialmente com monômeros para formar trímeros que, por sua vez, reagem com outro monômero para formar tetrâmeros. A contínua adição de espécies menos condensadas às mais condensadas resulta na formação de cadeias e redes interconectadas. Para valores de pH acima de 7, as partículas de sílica apresentam maior probabilidade de estarem ionizadas e, por isso, se repelem mutuamente. Dessa forma, o principal mecanismo de crescimento é por adição de monômeros às partículas mais condensadas e não por agregação. Além disso, nessas condições básicas, a solubilidade das partículas influencia no tamanho médio final, uma vez que a taxa de crescimento está relacionada à solubilização de partículas menores (mais solúveis) e sua posterior deposição em partículas maiores. Aqui, a temperatura também se destaca como um fator importante, dado que a solubilidade da sílica é maior em temperaturas mais elevadas (BARRIONI, 2018; BRINKER; SCHERER, 1990).

Além dos parâmetros citados acima, o método de secagem e o tratamento térmico utilizados também tem grande influência sobre a forma e as propriedades do vidro bioativo obtido ao fim do processo. Dentre as várias formas possíveis para os vidros bioativos, as partículas nanométricas esféricas e densas se destacam como boas candidatas a reforços de estruturas poliméricas e para liberação controlada de agentes terapêuticos. Partículas densas, por apresentarem área superficial menor do que partículas mesoporosas, podem ser uma escolha de material superior se deseja-se obter taxas mais lentas de dissolução e consequente

liberação desses agentes terapêuticos (EROL-TAYGUN; ZHENG; BOCCACCINI, 2013; LIVERANI *et al.*, 2018).

Um método pioneiro foi relatado por Stöber para a obtenção de nanopartículas esféricas e monodispersas em meio básico. A síntese ocorre com o uso de TEOS como precursor e hidróxido de amônia como catalisador. O meio alcalino resulta na repulsão entre as partículas formadas, como descrito acima. Dessa forma, são obtidas partículas cujos diâmetros estão no intervalo entre 50nm e 1µm. Stöber correlaciona ainda uma série de parâmetros do processo que influenciam no tamanho final das partículas, como a razão entre as quantidades de solvente e precursor, valor do pH, temperatura de reação e o tipo de precursor (STÖBER; FINK; BOHN, 1968; ZHENG; BOCCACCINI, 2017).

BARRIONI *et al.* (2019) utilizou um método de Stöber modificado para produção de nanopartículas esféricas de vidro bioativo com incorporação de manganês. Utilizando uma mistura de etanol absoluto, água destilada e hidróxido de amônio, além de TEOS como precursor, obteve-se nanopartículas esféricas de vidro com tamanho de até $142,3 \pm 10,8$ nm, após a incorporação de manganês. Os resultados obtidos demonstram ainda que nanopartículas produzidas por esse método tem grande potencial para aplicação na engenharia de tecidos devido à sua biocompatibilidade e bioatividade. Além disso, foi possível a incorporação de íons metálicos terapêuticos sem provocar alteração na morfologia esférica das partículas (BARRIONI *et al.*, 2019; GREASLEY *et al.*, 2016). Por esse motivo, esse foi o método selecionado para realização desse trabalho.

3.3.2 Aplicações biomédicas dos VBs para Engenharia de Tecidos Cardíacos

Os VBs foram inicialmente conceptualizados para a aplicação no tratamento de danos no tecido ósseo. De fato, essa aposta se mostrou bem sucedida e, ao longo dos anos, os VBs se consolidaram no emprego para reparo e regeneração óssea. Nos últimos anos, porém, as biocerâmicas e, em especial os VBs, tem sido

investigados como materiais muito promissores para aplicações na área de tecidos moles (COHRS *et al.*, 2017). Propriedades intrínsecas já documentadas, como a promoção do crescimento celular, indução da angiogênese e atividade anti-microbiana, são ideais para compor sistemas que visam a reparação ou a formação de diversos órgãos. Para a engenharia de tecidos cardíacos, a promoção do crescimento celular e a indução da angiogênese são particularmente importantes, já que um dos grandes problemas enfrentados na área é a falta de vasos sanguíneos funcionais nos enxertos produzidos em laboratório, que resultam na morte das células que compõem o tecido fabricado (BAINO; HAMZEHLU; KARGOZAR, 2018; BARABADI *et al.*, 2016).

CHEN *et al.* (2010) produziu nanocompósitos elastoméricos a partir de poliglicerol sebacato (PGS) e nanopartículas de vidro bioativo, de composição 45S5. A biodegradação do PGS resulta na acidificação do meio, resultando em morte celular. As partículas de vidro bioativo foram adicionadas para contrabalancear esse efeito, uma vez que seus produtos de dissolução são levemente básicos. O material resultante apresentou grande melhora na biocompatibilidade e propriedades mecânicas compatíveis com o tecido cardíaco.

Considerando a necessidade já citada da formação de vasos sanguíneos funcionais, BARABADI *et al.* (2016) investigou o efeito de nanopartículas de vidro bioativo, também de composição 45S5, na promoção da angiogênese quando incorporadas a *scaffolds* de colágeno e gelatina, destinados a aplicação na engenharia de tecido miocárdico. O material resultante apresentou boa biocompatibilidade e promoveu a diferenciação de células tronco em linhagens endoteliais, indicando uma melhora na vascularização do tecido final. Hidrogéis injetáveis de alginato com nanopartículas de vidro de mesma composição foram investigadas por QI *et al.* (2020) como uma alternativa para tratamento regenerativo de tecido miocárdico infartado. Foi constatado que a adição das nanopartículas melhorou a vascularização do tecido danificado, o que resultou na melhora da função cardíaca.

Partículas de vidro bioativo contendo SiO_2 , CaO e P_2O_5 também foram investigadas isoladamente como agentes para promoção da angiogênese no tecido cardíaco e verificou-se um aumento na produção e secreção de fatores de crescimento endotelial, como VEGF, por parte dos cardiomiócitos (SHI; ZHAO; *et al.*, 2021). Partículas de VB também demonstraram um efeito protetivo sobre as células cardíacas quando um tecido cardíaco infartado foi submetido a reperfusão, uma forma de tratamento para isquemias cardíacas, indicando a sua viabilidade para aplicações na regeneração do tecido miocárdico (SHI; CAO; *et al.*, 2021).

Os estudos citados acima empregaram o VB com o objetivo de explorar a sua capacidade intrínseca de indução da angiogênese, mas se restringiram a composições contendo cálcio. Recentemente, novas composições de VB vêm sendo investigadas, com a adição de íons metálicos que potencializam essas propriedades desejáveis para aplicações em tecidos moles. Trabalhos anteriores mostraram, por exemplo, que VBs com capacidade de liberação de cobalto se mostraram mais eficazes na promoção da angiogênese quando comparados a VBs sem a incorporação de cobalto (DE LAIA *et al.*, 2021).

No entanto, a aplicação de VBs de composição tradicional, contendo cálcio, em tecidos moles pode aumentar o risco de uma calcificação indesejada. Como esse risco ainda não foi extensivamente avaliado, composições binárias contendo apenas sílica e o íon metálico desejado se mostram promissoras (KARGOZAR *et al.*, 2018; KARGOZAR; HAMZEHLU; BAINO, 2017).

3.3.3 Incorporação de íons terapêuticos em VBs

Nanopartículas de VB são altamente reativas e solúveis em fluidos corporais e, por isso, são capazes de liberar íons em solução. Muitas das propriedades dos VBs estão associadas aos produtos da sua dissolução, de forma que é possível modificar a composição do vidro para se obter as propriedades desejadas, uma vez que se conheça os efeitos dos componentes utilizados (HOPPE; MOURIÑO;

BOCCACCINI, 2013). Os efeitos terapêuticos de diversos íons metálicos que podem ser incorporados à estrutura do vidro já foram investigados. Por exemplo, o cálcio favorece a mineralização da matriz extracelular e promove a diferenciação de osteoblastos, enquanto que a liberação de Si contribui para os estágios iniciais de calcificação da matriz óssea. A prata, assim como o cobre, apresenta efeito antimicrobiano, muito explorado em aplicações para tratamento de feridas cutâneas. O cobre também é capaz de promover a vascularização, bem como o cobalto (BARRIONI *et al.*, 2018; KARGOZAR; HAMZEHLU; BAINO, 2017; MOURA *et al.*, 2017).

Esses íons metálicos podem ser incorporados à rede do vidro de duas formas. Para processos sol-gel catalisados por bases, como aqueles baseados no método descrito por Stöber, a incorporação se dá pela imersão das partículas de sílica sintetizadas numa solução de sais metálicos e posterior calcinação. Durante a imersão, os íons se adsorvem à superfície da partícula e durante o tratamento térmico se difundem para o interior do material. Em geral, são utilizadas soluções com excesso de sais, uma vez que a incorporação do íon precursor ao material pode não ser completa. No entanto, observa-se para esse método a manutenção da morfologia esférica das nanopartículas (BARRIONI *et al.*, 2019; NARUPHONTJIRAKUL *et al.*, 2016). Para outros tipos de processo sol-gel, sais metálicos podem ser adicionados durante a síntese. Nesse caso, a incorporação de íons é mais eficiente e a composição final do vidro é mais próxima da composição nominal da solução. Isso acontece devido ao tamanho nanométrico das partículas do sol, que são capazes de adsorver uma quantidade maior de íons do que as partículas maiores do material já finalizado (ZHENG; BOCCACCINI, 2017). No entanto, a incorporação de íons nessa etapa pode afetar a morfologia das partículas, provocando a aglomeração e perda do formato esférico desejado (GREASLEY *et al.*, 2016).

3.3.3.1 VBs contendo Cobalto

O cobalto é um metal cuja forma iônica em meios fisiológicos apresenta uma bem documentada capacidade de promoção da angiogênese. A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma estrutura vascular pré-existente, e o seu estímulo é visto como terapia potencial para várias doenças, como as doenças arteriais coronarianas, para tratamento de feridas e para a regeneração de tecidos. Além disso, é um dos aspectos mais importantes a ser investigado na engenharia de tecidos, uma vez que está diretamente ligado ao sucesso de implantes sintéticos projetados para substituir e reparar tecidos corporais danificados (KARGOZAR *et al.*, 2018). A angiogênese é controlada pela disponibilidade de oxigênio e pela presença de fatores de crescimento vascular endotelial. Em condições normais de oxigenação, o fator de indução da hipóxia (HIF-1 α) é produzido e degradado à uma taxa constante. No entanto, em condições hipóxicas, a sua degradação é inibida e resulta na promoção da transcrição de genes que promovem a vascularização, codificando a produção de fatores pró-angiogênicos. O cobalto atua como um estabilizador do HIF-1 α e, portanto, simula condições de hipóxia, desencadeando a resposta fisiológica que resulta na neovascularização. Assim, materiais com capacidade de liberação controlada de cobalto têm sido amplamente investigados como uma alternativa para promover a vascularização de implantes e tecidos produzidos em laboratório, ou em tecidos danificados por doenças causadas por uma queda no suprimento de sangue (BARRIONI *et al.*, 2018; CHAI *et al.*, 2018; KARGOZAR *et al.*, 2018).

Devido às suas propriedades angiogênicas, o cobalto é investigado também como um possível agente terapêutico para o tratamento de doenças cardiovasculares (OKA; MORITA; KOMURO, 2016). ENDOH *et al.* (2000) observou uma melhora na função cardíaca de ratos que sofreram infarto do miocárdio após o tratamento com cloreto de cobalto (CoCl₂) em baixas concentrações. BELAIDI *et al.* (2012) reportou também uma redução significativa da região infartada em ratos pré-tratados com CoCl₂, além de um aumento considerável do fluxo sanguíneo na

região após o infarto. Além do efeito angiogênico, NG *et al.* (2011) reportou a promoção da diferenciação e maturação de células tronco embrionárias em cardiomiócitos, também relacionada ao efeito de estabilização do HIF-1 α , um efeito desejável para produção de enxertos cardíacos.

Vidros bioativos contendo cobalto têm sido estudados nos últimos anos como um veículo de liberação controlada desse íon e incorporados em aplicações em que a angiogênese é necessária, como para a regeneração de tecidos ósseos ou para o tratamento de feridas cutâneas. VBs contendo cobalto foram sintetizados via rotas de fusão e sol-gel (AZEVEDO *et al.*, 2010; HOPPE *et al.*, 2015). Esses estudos mostraram que o cobalto atua com um modificador de rede, reduzindo a fração de ligações Si-O-Si, e que é liberado no meio à medida em que a dissolução das partículas prossegue (KARGOZAR *et al.*, 2018). A composição do vidro deve ser formulada de tal maneira que a concentração de cobalto se mantenha dentro dos limites terapêuticos, uma vez que concentrações muito elevadas são tóxicas. Estudos *in vitro* e *in vivo* relataram faixas de concentração entre 3 e 13ppm de íons Co²⁺ para que seja observada a promoção da angiogênese pelos mecanismos já discutidos (BARRIONI. *et al.*, 2018). No entanto, foi reportada também uma diminuição da viabilidade celular após exposição a concentrações de Co de 10 ppm após 72h (FLEURY *et al.*, 2006). A resposta angiogênica induzida por VBs contendo cobalto, derivados da composição 58S, foi investigado em ensaios *in-vitro* e *in-vivo* por DE LAIA *et al.*, (2021). Foi demonstrado que o vidro estimulou a formação de estruturas tubulares em HUVECs, típicas do processo de neovascularização, além de promover um aumento na expressão de fatores pró-angiogênicos como HIF-1 α e VEGF.

A preparação de scaffolds a partir desses materiais também mostrou bastante eficaz na capacidade de induzir a expressão dos fatores biológicos responsáveis pela angiogênese, como VEGF (WU *et al.*, 2012). *Scaffolds* fibrosos de policaprolactona foram produzidos com a incorporação de partículas de VB contendo cobalto com o intuito de promover a indução da angiogênese em tecidos

moles, demonstrando um aumento significativo na expressão de fatores de crescimento vascular endotelial (CHEN, SI *et al.*, 2020). Dessa forma, materiais contendo vidros bioativos dopados com cobalto são bastante promissores para a engenharia de tecidos moles, incluindo a engenharia de tecido cardíaco.

4. METODOLOGIA

A metodologia empregada nesse estudo foi subdividida em duas etapas: a síntese de nanopartículas de vidro bioativo com a incorporação de íons de cobalto por meio de uma rota sol-gel e, em seguida, a caracterização química, morfológica, textural e estrutural das nanopartículas obtidas. O fluxograma ilustrado na Figura 4.1 indica as etapas de execução propostas nesse trabalho.

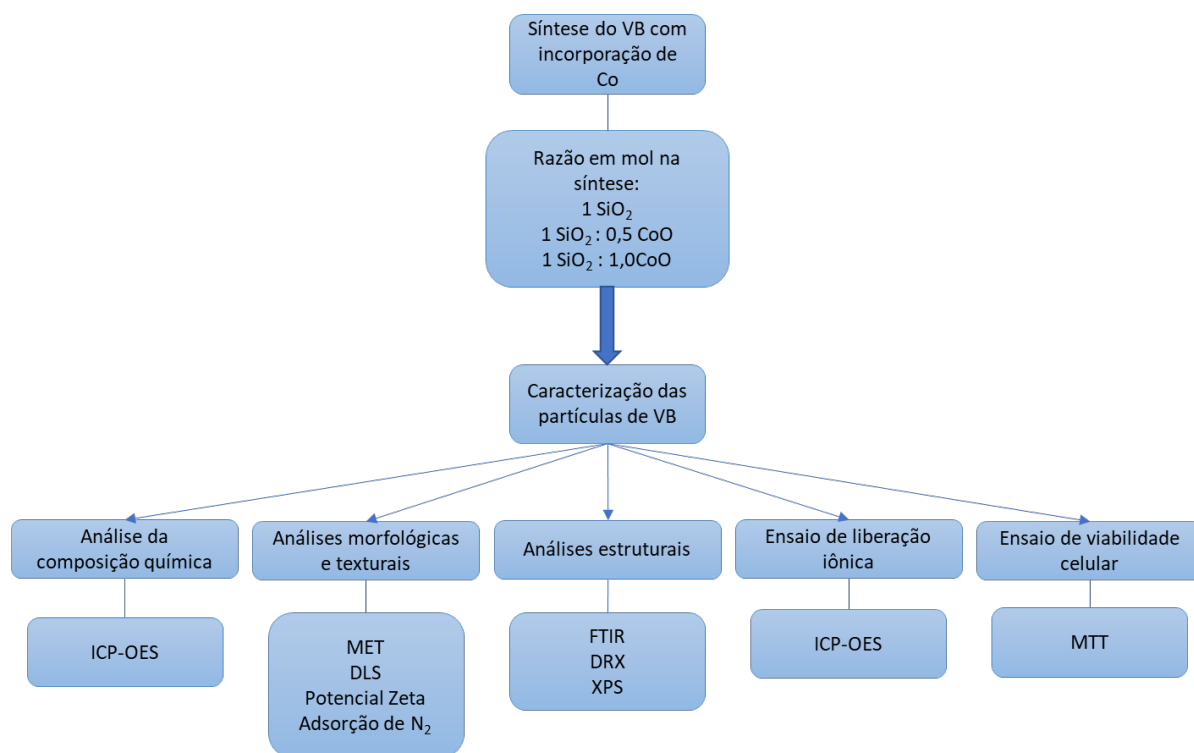


Figura 4.1: Procedimento experimental

4.1 Materiais

Para as sínteses e caracterizações realizadas foram utilizados reagentes em grau analítico (P.A.) e água deionizada milli-Q para o preparo de soluções.

Para a síntese do vidro bioativo, foram utilizados Tetraetilortossilicato (TEOS: $C_8H_{20}O_4Si$ – 98% de pureza, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), hidróxido de amônio (NH_4OH , Synth), álcool etílico absoluto ($EtOH$, C_2H_6OH – 99,8% de pureza, Êxodo Científica) e nitrato de cobalto hexahidratado ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, Êxodo Científica).

4.2 Síntese das partículas nanométricas de Vidro Bioativo contendo Cobalto via rota Sol-Gel

A metodologia de obtenção das nanopartículas de VB adotada nesse trabalho foi adaptada da metodologia empregada por BARRIONI *et al.* (2019) para produção de partículas nanométricas de VB contendo manganês. Nesse trabalho, tem-se como objetivo a obtenção de partículas em um sistema binário de sílica e cobalto a partir de uma modificação do método de Stöber e utilizando-se nitrato de cobalto ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) como precursor de cobalto.

Para produção das nanopartículas, etanol absoluto, água destilada e hidróxido de amônio (NH_4OH) foram misturados por 10 minutos sob agitação magnética. Em seguida, TEOS foi adicionado lentamente à solução, que permaneceu sob agitação magnética por 12h. A suspensão foi então centrifugada a 7000 rpm por 40 minutos para coleta das partículas de SiO_2 , que foram lavadas com etanol por três vezes e secas a 60°C por 24h. Foram usadas concentrações de 0,28M TEOS, 0,23M NH_4OH e 6M H_2O .

Após a secagem, as partículas foram submetidas a um tratamento térmico a 680°C por 3h, a uma taxa de aquecimento de 3°C por minuto, para obtenção da amostra controle de sílica pura (VB).

Para a obtenção de amostras contendo cobalto, as partículas de sílica foram dispersas em uma solução contendo $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, em diferentes proporções molares entre sílica e cobalto, como indicado na Tabela 4.1, por 30 minutos. A suspensão foi então centrifugada a 7000 rpm e as partículas foram coletadas e secas por 24h a 60°C. Em seguida, a amostra foi submetida a um tratamento térmico a 680°C por 3h a uma taxa de aquecimento de 3°C por minuto. Finalmente, as partículas foram lavadas com etanol por duas vezes e uma vez com uma solução de ácido nítrico 2M para remoção do excesso de íons que não foram incorporados à estrutura do vidro. A escolha das razões molares Si:Co se basearam nos trabalhos de GREASLEY *et al.* (2016), NARUPHONTJIRAKUL *et al.* (2016) e BARRIONI. *et al.* (2019) em que íons cálcio, estrôncio e manganês, respectivamente, foram incorporados a nanopartículas de VB seguindo uma metodologia similar.

Tabela 4.1: Razão molar Si:Co para síntese das amostras de Vidro Bioativo

Amostras	Razão molar Si:Co
VB	1 Si : 0 Co
VB05Co	1 Si : 0,5 Co
VB1Co	1 Si : 1,0 Co

4.3 Caracterizações das partículas de VB

4.3.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)

A composição das partículas de VB foi analisada por meio de ICP-OES no equipamento Optima 7300 DV (PerkinElmer, EUA). Para essa análise, foi pesado 0,1g das amostras de VB, que foram transferidas para um cadinho de grafite, contendo 0,7g de metaborato de lítio. Foi feita outra adição de metaborato de lítio ao cadinho, de 0,7g, e, em seguida, a mistura foi levada à mufla a uma temperatura de $950 \pm 25^\circ\text{C}$ por 10 minutos. O cadinho foi posteriormente retirado do equipamento, a mistura nele contida foi homogeneizada e então retornada à mufla

por 10 minutos adicionais à mesma temperatura. Em seguida, a mistura foi transferida para um béquer contendo 100mL de solução de ácido nítrico 10% (v/v) e submetida a agitação até atingir-se a completa dissolução. Finalmente, a solução resultante foi transferida para tubos falcon para armazenamento e posterior análise no ICP. A partir dessas análises, pode-se medir as concentrações de Si e Co presentes nas nanopartículas, e o teor de SiO₂ e CoO foi calculado.

4.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para avaliação da morfologia das nanopartículas foram realizadas análises em um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-20 - FEI SuperTwin 200 kV. Para tanto, as amostras foram dispersas em etanol e sonicadas por 30 minutos a uma concentração de 0,1 mg/mL. Posteriormente, algumas gotas da dispersão foram colocadas em uma grade de cobre de 400 mesh recoberta com um filme de carbono apropriada para utilização no MET.

Para avaliação do tamanho de partículas das amostras, o diâmetro das partículas foi medido a partir das imagens obtidas no MET, utilizando-se o software ImageJ. Para cada composição de VB, foram medidas 100 partículas.

4.3.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e medição do potencial Zeta (PZ)

Para medição do potencial Zeta e do diâmetro hidrodinâmico das partículas de VB, as amostras foram dispersas a uma concentração de 0,01 mg/mL em água deionizada e metanol, respectivamente. Em seguida, as dispersões foram submetidas ao banho ultrassônico por 20 minutos e, em seguida, ao ultrassom de ponta, por 20 minutos, para dispersão mais eficiente das partículas. As análises foram conduzidas no equipamento Zetasizer 3000 HS 1256, com um laser de 4mW de hélio/neon, de comprimento de onda 633nm. Os resultados finais foram obtidos a partir da média aritmética de 5 medições.

4.3.4 Adsorção de nitrogênio

Para avaliação das propriedades texturais dos VB, as amostras foram desgaseificadas a 200° por 24h. Em seguida, o equipamento Quantachrome – NOVA 2200 foi utilizado para a obtenção das isotermas de adsorção e dessorção de N₂, a 77K. A área superficial específica das amostras foi determinada pela metodologia de Brunauer-Emmett-Teller (BET), com os pontos de adsorção com pressão relativa (P/P₀) entre 0,01 e 0,30. Utilizando os dados das curvas de dessorção, os diâmetros médios de poros foram calculados pelo método Barrett-Joyner-Halenda (BJH).

4.3.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR (*Bruker Alpha*) foram realizadas nos VBs para caracterização química qualitativa, a partir da detecção dos grupos funcionais presentes nas amostras. As análises foram feitas em modo ATR (reflectância total atenuada), em uma faixa de números de onda entre 400 cm⁻¹ e 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e no decurso de 128 escaneamentos.

4.3.6 Difração de raios-X (DRX)

A análise por DRX foi empregada para avaliação da cristalinidade das partículas de vidro bioativo contendo cobalto e dos *scaffolds* compósitos. Os difratogramas foram obtidos com um passo de 0,06° na escada de varredura entre 4,05° e 89,95°, e radiação Cu K α , com $\lambda = 1,54018\text{\AA}$, a 40kV.40mA-1, com eixo de transmissão de 2 θ , no equipamento Phillips PW1700.

4.3.7 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

A análise de XPS foi conduzida utilizando-se o equipamento Amicus, Kratos, com radiação Al-K-alfa. A corrente de emissão da fonte de raios-X foi de 10mA e a tensão de 12mV. Deslocamentos da energia de ligação devido ao acúmulo de cargas foram corrigidas utilizando a linha C 1s, com BE = 285,0 kV (BARRIONI *et al.*, 2021). Espectros de alta resolução foram obtidos para Si 2p, O 1s e Co 2p.

4.3.8 Liberação de íons Co^{2+}

A avaliação da capacidade de liberação de íons cobalto pelas partículas de VB foi feita utilizando-se o meio fisiológico de tampão fosfato-salino (PBS). Para tanto, 45mg de nanopartículas de VB nas diferentes concentrações analisadas, foram dispersas em PBS, a uma temperatura constante de 37°C, na concentração de 1,5 mg/mL (MAÇON *et al.*, 2015). Após diferentes períodos de tempo (0h, 4h, 8h, 24h, 3 dias, 7 dias e 14 dias) alíquotas de 1mL foram coletadas das amostras e diluídas em 9mL de uma solução de ácido nítrico (2M) para posterior leitura por ICP-OES para determinação das concentrações de silício e cobalto em solução. Em seguida, 1mL de PBS foi acrescentado novamente aos frascos contendo as amostras. As análises foram realizadas em triplicata e um frasco contendo apenas PBS, sem partículas, foi submetido ao mesmo procedimento como uma amostra controle.

4.3.9 Análise de viabilidade celular por MTT

Para avaliação da citotoxicidade das partículas de VB, células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVECs - ATCC) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e DMEM F12, com adição de soro fetal bovino (FBS) e penicilina/estreptomicina. As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera úmida de 5% de CO_2 até 90% de confluência.

A biocompatibilidade das amostras foi avaliada através do ensaio de brometo de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). As HUVECs foram semeadas em uma placa de 48 poços. Após serem cultivadas por 24h, as células foram tratadas com soluções preparadas pela dispersão de todas as amostras de VB em 1xPBS (concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Uma amostra de controle negativo foi tratada apenas com 1xPBS. Após esta etapa, os grupos celulares foram avaliados em 24, 48 e 72h. O meio foi removido e uma solução contendo 130 μL de DMEM/DMEM F12 e 100 μL de MTT foi adicionada a cada poço. Após 2 h, os cristais de formazan foram observados ao microscópio óptico e dissolvidos em 130 μL de SDS a 10% em HCl 0,01 M. Para todas as etapas descritas acima, as placas de cultura foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO_2 . Após 18 horas, 100 μL da solução foram transferidos para uma placa de 96 poços para medição da absorbância a 595 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas.

5. RESULTADOS

5.1 Composição química

A Tabela 5.1 apresenta a razão molar nominal utilizada nas sínteses de vidro bioativo e as composições químicas obtidas, em %mol, por digestão ácida e ICP-OES. A avaliação da composição química permite uma correlação adequada do vidro com a sua estrutura e a constatação da obtenção de um material de composição binária, contendo sílica e óxido de cobalto, como proposto. Foram observadas diferenças significativas entre a composição determinada por ICP-OES e a razão molar empregada na síntese do material. Nesse método, obtêm-se inicialmente as partículas de sílica puras e, em seguida, adiciona-se o precursor de cobalto em excesso para incorporação do íon a rede, obtendo-se a concentração máxima de $11,1 \pm 0,4$ %mol para as amostras VB1Co. Trabalhos anteriores que utilizaram métodos semelhantes para a incorporação de íons em nanopartículas densas de sílica reportaram concentrações similares, numa faixa entre 7 e 13% (BARRIONI *et al.*, 2019, 2021; GREASLEY *et al.*, 2016). NARUPHONTJIRAKUL *et al.* (2016), por exemplo, reportou concentrações de íons que variaram de 7,2% de Ca a 12,9% de Sr em nanopartículas densas de sílica, obtidas de forma similar. No processo de centrifugação subsequente, anterior ao tratamento térmico, parte da solução precursora de cobalto é descartada. Os precursores que se depositaram na superfície da partícula durante o processo de secagem podem ser incorporados à rede vítrea por difusão iônica, em processo posterior de tratamento térmico (BARRIONI *et al.*, 2019; GREASLEY *et al.*, 2016).

Após o tratamento térmico, foram empregados processos de lavagens e centrifugação subsequentes para a remoção de sais que podem se formar nas superfícies das partículas. A presença desses sais em partículas que não passaram pelas lavagens indica que nem todos os íons depositados na superfície são capazes de se difundir e serem incorporados à estrutura da rede vítrea (GREASLEY *et al.*, 2016).

É possível observar ainda que todas as amostras apresentam um elevado teor de sílica, próximo a 90%. Embora a bioatividade de VBs obtidos por rota de fusão seja prejudicada para teores tão elevados de sílica, VBs produzidos via rotas sol-gel apresentam significativa bioatividade mesmo para essas concentrações. Essa propriedade está relacionada a maior desorganização da rede estrutural que forma o material devido à presença de grupos -OH que interrompem a rede de sílica e garantem uma elevada taxa de dissolução (LABBAF *et al.*, 2011; ROMÁN; PADILLA; VALLET-REGÍ, 2003).

Tabela 5.1: Razão molar e composição química (%mol) das amostras de vidro bioativo determinadas pelo método de digestão ácida e por ICP-OES.

Amostras	Razão molar Si:Co	Composição medida (%mol)	
		SiO ₂	CoO
VB	1:0	100 ± 0,0	0 ± 0
VB05Co	2:1	91,1 ± ,01	8,9 ± 0,1
VB1Co	1:1	88,9 ± 0,4	11,1 ± 0,4

Assim, baseando-se nos dados obtidos a partir da análise por ICP-OES, pode-se afirmar que o método de síntese empregado foi bem sucedido na produção de amostras com incorporação de cobalto ao sistema, podendo este ter sido incorporado à rede de sílica ou ter se depositado em fases adicionais na superfície das partículas. Vale ressaltar ainda que a composição final das amostras contendo cobalto foi similar, ainda que a concentração de Co adicionado às amostras VB1Co tenha sido o dobro daquela adicionada à amostra VB05Co. Dessa forma, a adição de grandes quantidades de Co não se faz necessária, visto que as composições finais foram próximas, o que indica que a razão molar Si:Co de 2:1 pode ser ideal.

5.2 Análises morfológicas e texturais

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Micrografias das amostras de vidro bioativo com diferentes concentrações de cobalto estão apresentadas na Figura 5.1. A análise das imagens permite constatar a obtenção de nanopartículas densas e esféricas a partir da rota sol-gel empregada para todas as composições obtidas, cujos tamanhos variaram de 63 ± 9 nm a 66 ± 7 nm. Vale ressaltar que partículas esféricas, de morfologia regular, demonstram propriedades físico-químicas e biológicas superiores se comparadas a partículas de formatos irregulares, como a minimização dos riscos de reações inflamatórias (LEI *et al.*, 2011).

Na Figura 5.2 estão apresentados os histogramas referentes à distribuição dos tamanhos de partícula medidos para cada uma das amostras. Pode-se observar que a distribuição estreita do tamanho de partículas indica a obtenção de partículas monodispersas.

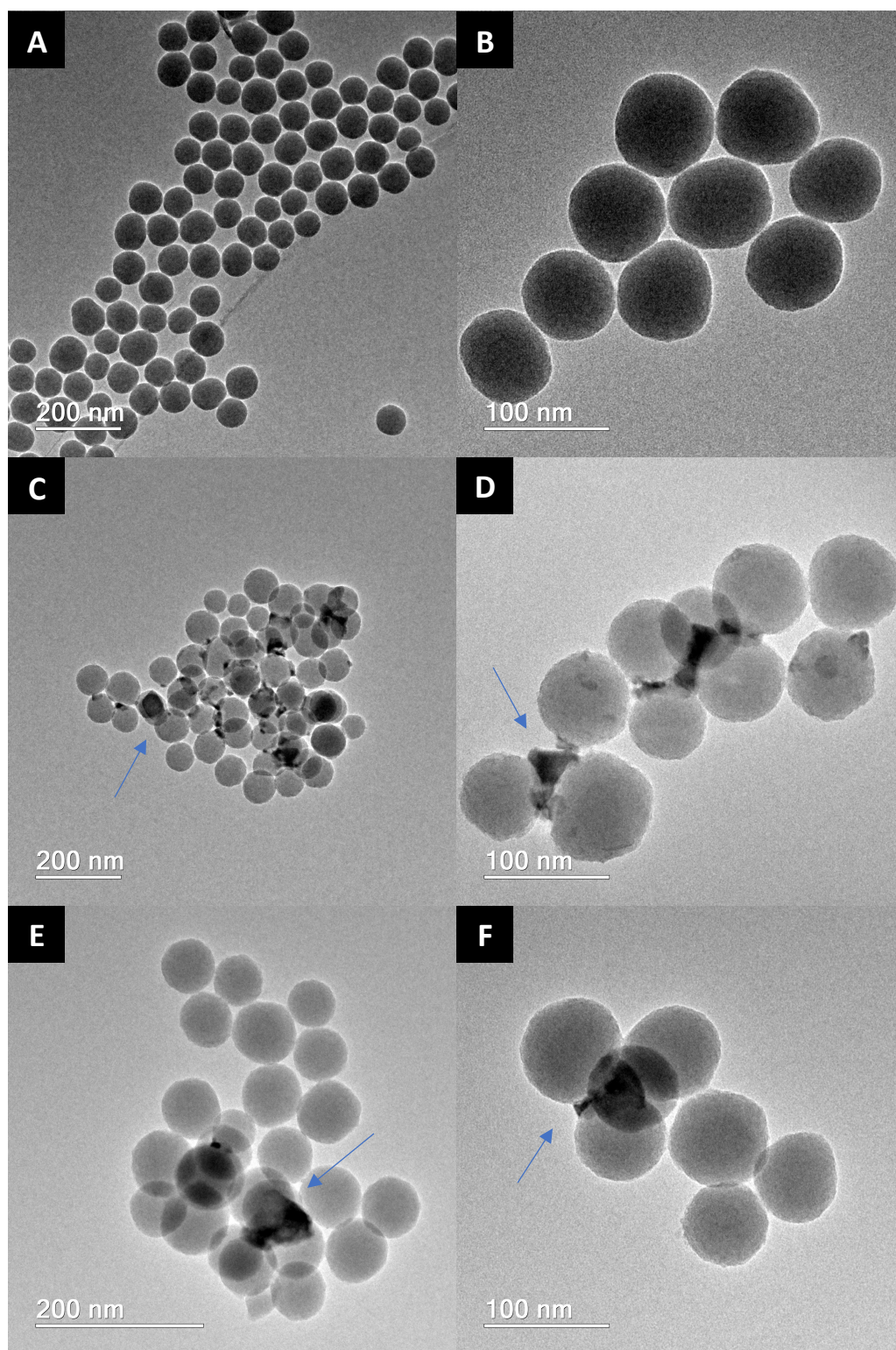


Figura 5.1: Imagens das nanopartículas obtida por MET. A e B: VB; C e D: VB05Co; E e F: VB1Co.

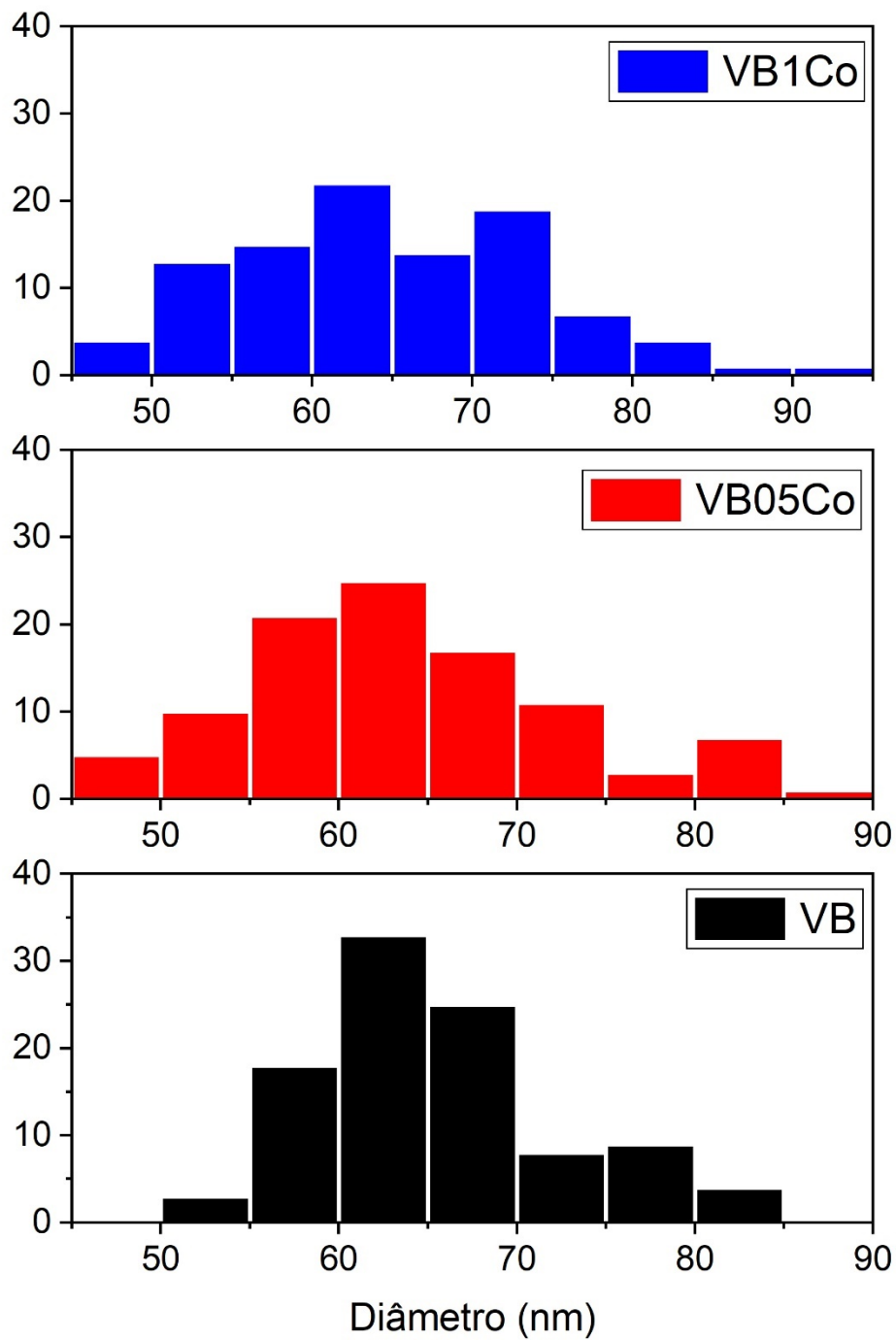


Figura 5.2: Histograma do diâmetro de partícula para as amostras de VB, VB05Co e VB1Co

Comparando-se ainda as três amostras, é possível observar uma fase extra nas micrografias, indicadas por setas azuis, referentes às amostras contendo cobalto, sugerindo que as etapas de lavagem não foram completamente eficazes na remoção do cobalto não incorporado. Essa fase adicional está possivelmente associada a formação de óxido de cobalto a partir de íons cobalto que se aderiram à superfície das partículas, mas que não se difundiram para o interior da rede vítrea, e pode facilitar a aglomeração das mesmas, como conforme reportado em trabalhos anteriores (GREASLEY *et al.*, 2016). A formação dessa fase cristalina provavelmente se dá pelo excesso de nitrato de cobalto utilizado durante a incorporação do metal à nanopartícula de sílica. Um método para obtenção de nanopartículas de óxido de cobalto (II,III) (Co_3O_4) consiste na cristalização de um precursor de cobalto, como o $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, sobre uma matriz polimérica por secagem, seguida de tratamento térmico a 600°C (BROCKNER; EHRHARDT; GJIKAJ, 2007; LUISETTO; PEPE; BEMPORAD, 2008; TUTI; PEPE, 2008). Assim, o polímero e os íons nitrato são decompostos e parte dos íons Co^{2+} são oxidados, levando à obtenção do Co_3O_4 (LUISETTO; PEPE; BEMPORAD, 2008). Portanto, é provável que parte do $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, usado como precursor de Co para incorporação na rede vítrea, se cristalizou na superfície do vidro após a secagem e foi convertido em Co_3O_4 durante o tratamento térmico, mas uma avaliação mais aprofundada é necessária para confirmar a deposição desse óxido como uma segunda fase. A baixa solubilidade desse óxido em água dificulta a sua remoção da superfície das partículas e, por isso, as amostras contendo cobalto foram submetidas à lavagem com uma solução de ácido nítrico. Em meio ácido, o óxido de cobalto se degrada. No entanto, o processo de degradação é lento e a fase extra depositada na superfície das partículas não foi completamente eliminada (ORTEGA *et al.*, 2014). A análise por MET mostrou então que esse método é eficaz para obtenção de nanopartículas densas de sílica e que a incorporação de cobalto ao sistema não resultou em alterações significativas na morfologia das partículas, embora tenha-se observado a formação de uma fase extra nas amostras contendo cobalto.

5.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (PZ)

Os tamanhos de partículas determinados por análise DLS, os tamanhos de partícula medidos a partir das imagens obtidas por MET e o Potencial Zeta medido para as três amostras de vidro estão descritos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Diâmetro Médio das partículas por DLS, MET e valores de Potencial Zeta para as amostras VB, VB05Co e VB1Co

Amostras	Diâmetro Médio (DLS) (nm)	Diâmetro Médio (MET) (nm)	Potencial Zeta (mV) (pH = 7; 25°C)
VB	58 ± 5	66 ± 7	-28,4 ± 3,4
VB05Co	93 ± 4	63 ± 9	-24,8 ± 2,1
VB1Co	112 ± 10	65 ± 9	-29,3 ± 3,2

A análise de variância dos diâmetros de partícula obtidos por microscopia eletrônica de transmissão revelou que não houve variação estatisticamente significativa no tamanho das partículas com a incorporação de cobalto, para um nível de significância de 5%. Comparando-se os valores de diâmetro hidrodinâmico das partículas, determinados por DLS, verificou-se que o tamanho de partícula aumentou com o aumento do teor de cobalto nas amostras. Nota-se ainda que esses valores são superiores àqueles medidos por MET para as amostras contendo cobalto. Essa discrepância se deve possivelmente à presença da fase extra formada na superfície das nanopartículas que, como observado nas micrografias apresentadas acima, favoreceu a aglomeração das mesmas, resultando em leituras maiores do diâmetro médio por DLS, enquanto que nas análises por MET o diâmetro real da partícula pode ser medido diretamente (GREASLEY *et al.*, 2016).

Além disso, trabalhos anteriores demonstraram que partículas nanométricas de tamanhos similares são capazes de serem internalizadas por diferentes tipos de células humanas, incluindo HSPCs e células epiteliais (BARRIONI *et al.*, 2021;

NARUPHONTJIRAKUL *et al.*, 2019). Dessa forma, as partículas obtidas são candidatas para liberação intracelular de íons terapêuticos, como o cobalto.

Na Tabela 5.1 estão relatados ainda os valores de Potencial Zeta, e observa-se que a carga superficial medida para todas as amostras é negativa e relativamente elevada, com valores entre $-29,3 \pm 3,2$ mV e $-24,8 \pm 2,1$ mV. Valores elevados de PZ, próximos a 30 mV, em módulo, conferem às partículas maior estabilidade eletrostática, o que dificulta a aglomeração e a floculação, o que é benéfico para nanopartículas para fins terapêuticos (CABANAS-POLO; BOCCACCINI, 2015; DOOSTMOHAMMADI *et al.*, 2011). Valores negativos de PZ são desejáveis ainda por promover a proliferação e a adesão celular, devido a grupos hidroxila que podem estar presentes na superfície do vidro (TAVAKOLIZADEH *et al.*, 2017).

5.2.3 Adsorção de nitrogênio

Para a avaliação de propriedades texturais, como área superficial e tamanho de poros, empregou-se métodos de análise por adsorção e dessorção de N₂ para todas as amostras. As isotermas referentes a essas análises estão apresentadas na Figura 5.3. Para todas as amostras foram observadas isotermas similares, do tipo III, com histereses do tipo H2, que podem ser atribuídas a materiais mesoporosos e, tipicamente associadas a estruturas porosas complexas, com poros parcialmente ou totalmente obstruídos. Na Tabela 5.3 estão apresentados os valores de área superficial obtidos por BET e do tamanho médio dos poros, obtidos pelo algoritmo BJH (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; EL-FIQI *et al.*, 2012; THOMMES *et al.*, 2015). Os valores de área superficial obtidos estão dentro do esperado para nanopartículas densas de vidro produzidas a partir de rotas similares, cujas área superficiais específicas variaram entre 35,9 e 48,1 m².g⁻¹, e a incorporação de cobalto não provocou alterações significativas nos valores obtidos (BARRIONI *et al.*, 2019, 2021). Partículas mesoporosas de tamanhos similares podem atingir áreas superficiais significativamente maiores, da ordem de 800 m².g⁻¹ (EL-FIQI; KIM,

2021). A menor área superficial de nanopartículas densas faz com que sua dissolução seja mais lenta e a liberação de íons no meio ocorre de forma mais controlada (EROL-TAYGUN; ZHENG; BOCCACCINI, 2013). Como íons cobalto podem ser tóxicos em concentrações elevadas, a morfologia densa é interessante para aplicações biomédicas (FLEURY *et al.*, 2006).

Vidros bioativos mesoporosos são comumente obtidos através da introdução de um surfactante durante a síntese sol-gel, como o CTAB, que atuam como agentes formadores de poros (EROL-TAYGUN; ZHENG; BOCCACCINI, 2013). O método empregado nesse trabalho para obtenção de nanopartículas não envolve a adição de nenhum agente formador de poros. Além disso, as imagens obtidas por MET não revelaram uma estrutura porosa em nenhuma das amostras. Dessa forma, é provável que a porosidade detectada pela análise por adsorção de N₂, com tamanhos médios de poros variando entre 21,8 e 23,8 nm, está relacionada ao espaço entre as partículas empacotadas durante a análise e não pela presença de poros no vidro bioativo (BARRIONI *et al.*, 2019).

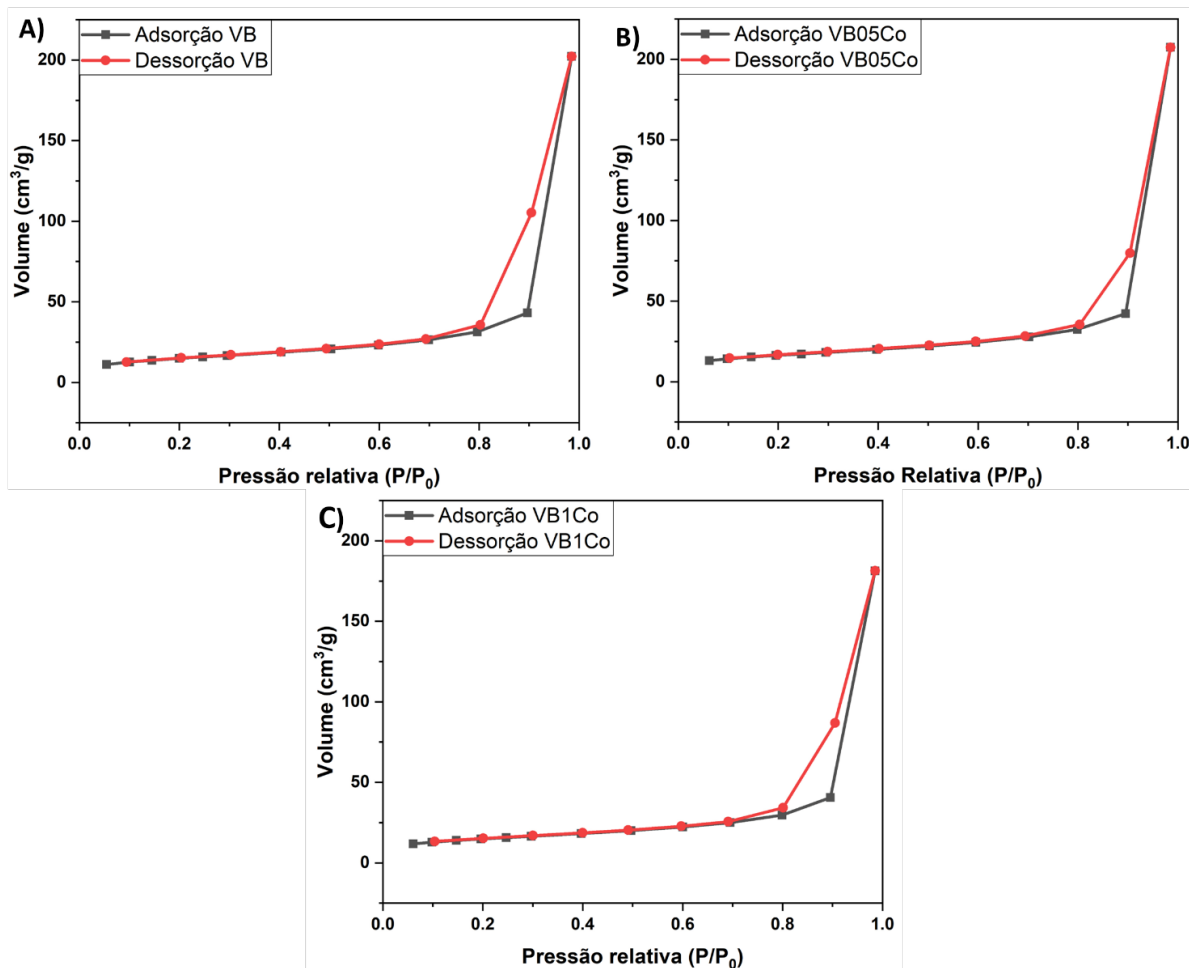


Figura 5.3: Isotermas de adsorção de N_2 das amostras A) VB; B) VB05Co e C) VB1Co.

Tabela 5.3: Propriedades texturais determinados por BET e BJH para as amostras VB, VB05Co e VB1Co.

Amostra	Área superficial específica (m^2/g)	Diâmetro médio de poros (nm)
VB	52,5	23,8
VB05Co	56,5	22,6
VB1Co	51,2	21,8

5.3 Caracterização estrutural

5.3.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Para a caracterização estrutural das nanopartículas foram feitas análises de FTIR das três amostras produzidas com diferentes concentrações de cobalto. Os resultados foram analisados e os espectros obtidos estão registrados, na Figura 5.4.

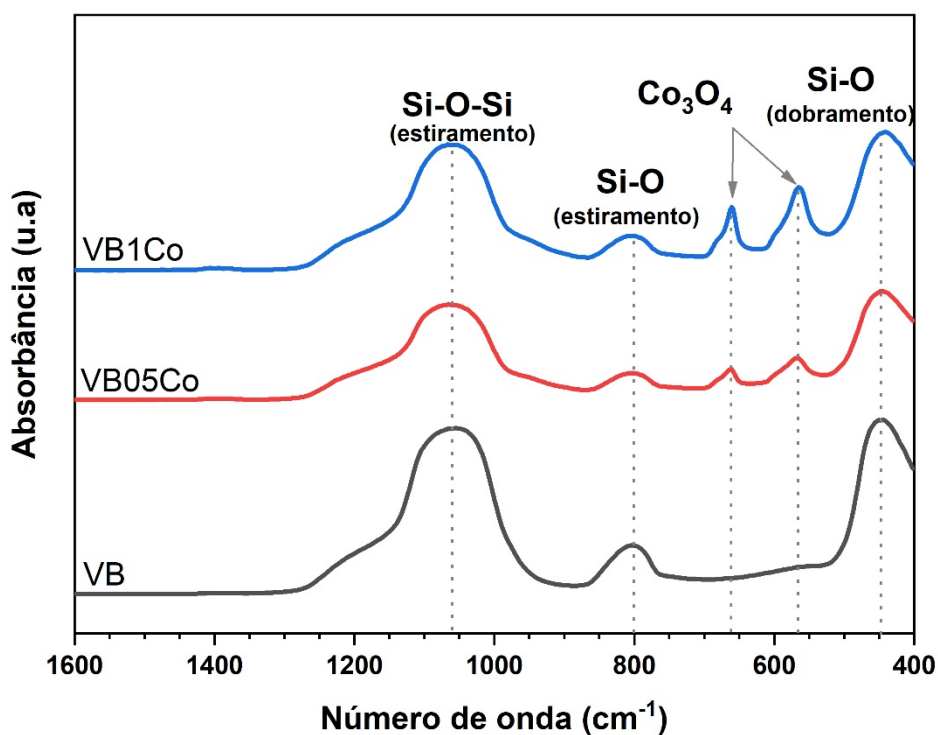


Figura 5.4: Espectros de FTIR obtidos para VB, VB05Co e VB1Co

Nos três espectros é possível observar as bandas de absorção típicas para vidros bioativos, relatadas na Tabela 5.4. A banda de absorbância na região em torno de 450 cm^{-1} , por exemplo, é indicativa do dobramento das ligações Si-O, tipicamente observadas em estruturas amorfas de sílica (LUZ; MANO, 2011). Já a banda observada em torno de 800 cm^{-1} é indicativa do estiramento simétrico dessas

ligações Si-O (BARRIONI *et al.*, 2018). A banda observada entre 1000 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} , pode ser atribuída ainda ao estiramento assimétrico das ligações Si-O-Si (HOPPE *et al.*, 2014). A presença dessas bandas de absorvência nas três amostras indica a manutenção da estrutura química principal do material mesmo após a incorporação de cobalto, indicando que a estrutura de silicato se manteve.

Tabela 5.4: Bandas de absorvência observadas por FTIR para as amostras de vidro bioativo contendo diferentes teores de cobalto.

ν (cm^{-1})	Atribuição	Referência
450	Dobramento das ligações Si-O	(LUZ; MANO, 2011)
800	Estiramento simétrico Si-O	(BARRIONI <i>et al.</i> , 2018)
1000 a 1200	Estiramento assimétrico Si-O-Si	(HOPPE <i>et al.</i> , 2014)
570	Estiramento Co^{3+} -O	(NASSAR, 2013)
670	Estiramento Co^{2+} -O	(NASSAR, 2013)

Além disso, nos espectros referentes às amostras contendo cobalto, VB05Co e VB1Co, foram observadas bandas de absorção centradas nas regiões em torno de 670 cm^{-1} e 570 cm^{-1} (DUBEY *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2011). A banda centrada em 670 cm^{-1} está relacionada ao estiramento da ligação do tipo M-O, em que M é Co^{2+} e se encontra tetraedricamente coordenado, enquanto que a banda observada em 570 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento de uma ligação do mesmo tipo, em que M é Co^{3+} e está coordenado octaedricamente, ambas presentes em estruturas cristalinas de Co_3O_4 (NASSAR, 2013). Dessa forma, a presença dessas bandas sugere a formação de uma fase adicional de óxido de cobalto (II,III), e a intensidade das bandas referentes ao óxido de cobalto (II,III) é notadamente maior na amostra VB1Co, sugerindo a presença de uma maior quantidade do óxido nessa amostra. Observou-se, portanto, que apesar da deposição de uma fase extra na superfície do vidro, a estrutura principal de silicato foi mantida após a incorporação de cobalto ao sistema.

5.3.2 Difração de Raios-X (DRX)

Os difratogramas obtidos por meio da Difração de Raios-X para as três amostras, com diferentes concentrações de cobalto, são apresentados na Figura 5.5.

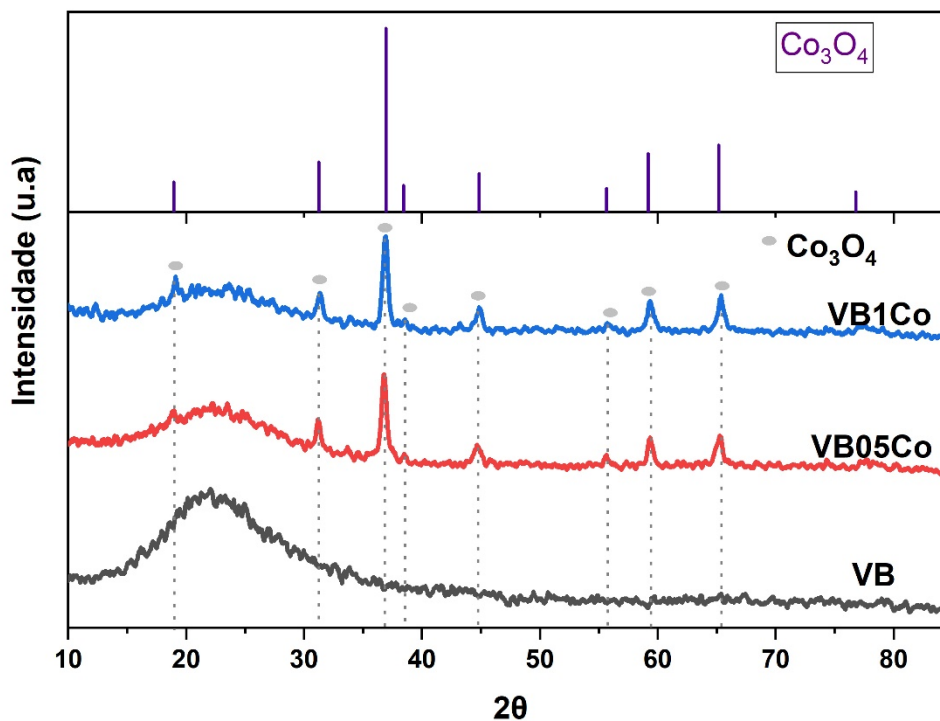


Figura 5.5: Padrões de difração de raios-X (DRX) das amostras VB, VB05Co e VB1Co e padrão JCPDS 00-001-1152 para Co_3O_4 .

Para todas as amostras, foi observado um halo amplo e difuso entre os valores angulares de $2\theta = 15^\circ$ e 30° . Esse padrão de difração é tipicamente observado em materiais de sílica predominantemente amorfos, sugerindo que nas três amostras, obteve-se uma estrutura principal de silicato amorfa (EL-FIQI; KIM, 2021). Estruturas amorfas são desejadas em detrimento a estruturas cristalinas, uma vez que a amorfia do material implica em uma rede parcialmente aberta, o que facilita a

permeação de moléculas de água e conseqüentemente a dissolução do vidro e a liberação de íons terapêuticos. Dessa forma, a bioatividade do material é favorecida (BARRIONI *et al.*, 2018; BRAUER, 2015).

Nos difratogramas correspondentes às amostras contendo cobalto, VB05Co e VB1Co, foram observados picos indicativos de uma fase cristalina. Esses picos são compatíveis com a estrutura cristalina cúbica de face centrada, típica de espinélio, do óxido de cobalto (II,III) (Co_3O_4 , JCPDS 00-001-1152), conforme relatado na Tabela 5.5. A presença desses picos corrobora os resultados obtidos nas análises de FTIR, que também apontaram para a presença de uma fase cristalina composta pelo óxido de cobalto (II,III) (NASSAR, 2013; WANG *et al.*, 2011). Apesar do caráter predominantemente amorfo das amostras, regiões cristalinas podem afetar negativamente a bioatividade do material, uma vez que resultam em uma taxa de dissolução mais lenta. No entanto, diversos estudos reportaram a obtenção de vitrocerâmicas bioativas e vidros com cristalinidade de até 40% não demonstraram redução na bioatividade (KAUR *et al.*, 2019; MONTAZERIAN; DUTRA ZANOTTO, 2016; PEITL; LATORRE; HENCH, 1996).

Tabela 5.5: Ângulos e planos cristalinos correspondentes para Co_3O_4 .

2θ (°)	Plano Cristalino	Referência
19	111	(WANG <i>et al.</i> , 2011)
32	220	(DUBEY <i>et al.</i> , 2018)
37	311	(DUBEY <i>et al.</i> , 2018)
39	222	(WANG <i>et al.</i> , 2011)
45	400	(GHADI; GHARA; NAEIMI, 2018)
56	422	(GHADI; GHARA; NAEIMI, 2018)
59	511	(GHADI; GHARA; NAEIMI, 2018)
65	440	(IQBAL <i>et al.</i> , 2019)

O Co_3O_4 é um óxido de valência mista, estável e pouco solúvel, que vem sendo investigado como um material em potencial para diversas aplicações biomédicas, como a liberação de fármacos, biosensores e engenharia de tecidos (ABBASI *et al.*, 2021; LEE; SUNG, 2020). Dentre suas aplicações biomédicas, o óxido de cobalto (II,III) se destaca por uma capacidade anti-oxidativa moderada, como reportado por GHADI *et al.*, 2018, IQBAL *et al.*, 2019 e KHALIL *et al.*, 2020. O interesse na pesquisa de antioxidantes naturais e sintéticos está relacionada à prevenção da oxidação descontrolada de lipídios, DNA e proteínas causadas por diversas doenças, como infecções, isquêmicas cerebrais e cardíacas, além de outras doenças cardiovasculares (BAHEIRAEI *et al.*, 2014; HALLIWELL, 1996). Tendo em vista que a presença de radicais livres em regiões danificadas do coração se dá em maior concentração e que essas concentrações podem ser danosas para as células, a presença de antioxidantes em materiais desenvolvidos para a engenharia de tecidos cardíacos é de grande importância (SHIEKH; SINGH; KUMAR, 2018; WASHINGTON; BASHUR, 2017). Assim, um sistema vitrocerâmico contendo Co_3O_4 na superfície das partículas pode ser favorável para a engenharia e para o reparo de tecidos.

5.3.3 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

Análises de XPS foram realizadas para investigar de forma mais detalhada a estrutura do vidro e a possível incorporação de Co na rede vítrea. Os espectros de ampla varredura para todas as amostras, mostrados na Figura 5.6, exibiram as linhas Auger e picos de fotoemissão característicos associados a todos os elementos constituintes do vidro. Um pico C 1s, relacionado a impurezas de hidrocarbonetos na superfície da partícula, também foi observado (SERRA *et al.*, 2003). A energia de ligação do pico C 1s, definida como 285,0 eV foi usada para corrigir os efeitos de carga da amostra (NESBITT *et al.*, 2011).

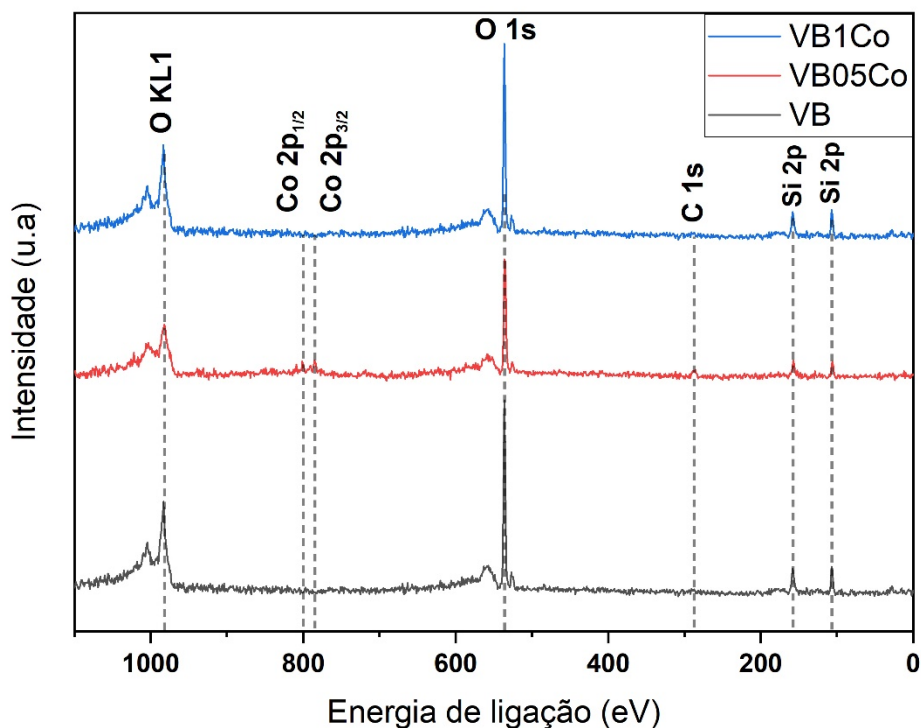


Figura 5.6: Espectros de XPS das amostras de VB, VB05Co e VB1Co

Uma banda larga dentro da faixa típica de energia de ligação para vidros à base de SiO_2 foi observada nos espectros de alta resolução Si 2p, apresentado na Figura 5.7, para todas as amostras (BARRIONI *et al.*, 2021; EL-FIQI; KIM, 2021). A banda de Si 2p foi mais larga para as amostras contendo Co, com a máxima referente à amostra VB1Co ligeiramente deslocada a valores de BE mais baixos (103,7 eV) quando comparados a VB e VB05Co (104,1 eV). Esse resultado é indicativo de uma mudança na proporção entre as espécies de oxigênio ligantes (BOs) e oxigênio não ligantes (NBO) na rede do vidro bioativo após a incorporação de cobalto. Os BOs são os responsáveis pela ligação de dois átomos de silício, dando origem a ligações do tipo Si-O-Si. Já os NBOs são aqueles ligados a um cátion metálico incorporado à estrutura do vidro como modificador de rede, resultando em ligações do tipo Si-O-Mⁿ⁺ (DALBY *et al.*, 2007; NESBITT *et al.*, 2011). Assim, diferentes espécies de

silicatos estão presentes e podem ser designadas como espécies Q^n , em que n é o número de BOs em uma unidade tetraédrica de sílica. A incorporação de íons modificadores de rede na estrutura do vidro resulta na substituição de unidades BO por unidades NBO, o que altera a proporção de espécies Q^n presentes no vidro (NESBITT *et al.*, 2011). Como a densidade eletrônica de cada átomo de silício é dependente do número de BOs e NBOs ligados a ele, é possível observar um deslocamento nos valores de energia de ligação do Si 2p para valores mais baixos à medida em que modificadores de rede são incorporados à estrutura do vidro (DALBY *et al.*, 2007). Portanto, os picos mais largos e os valores de BE ligeiramente deslocados das amostras contendo Co indicam que o cobalto também foi parcialmente incorporado à rede de vidro e atua como um modificador de rede. Os íons de cobalto foram incorporados à rede vítrea por um mecanismo de difusão durante o tratamento térmico em altas temperaturas (GREASLEY *et al.*, 2016). Esse é um processo que ocorre simultaneamente à oxidação parcial das espécies de Co^{2+} durante o tratamento térmico, o que leva à obtenção de Co_3O_4 na superfície das partículas bem como à incorporação de Co na estrutura do vidro.

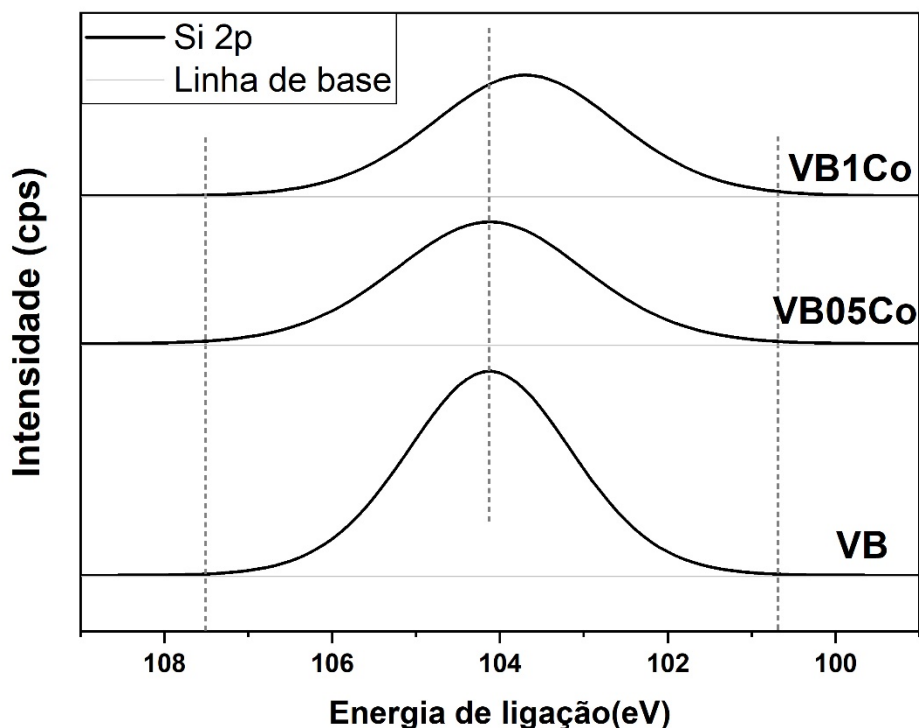


Figura 5.7: Espectro de alta resolução Si 2p das amostras VB, VB05Co e VB1Co

Analogamente ao que foi observado nos espectros de alta resolução Si 2p, nos espectros referentes ao O 1s (Figura 5.8) observou-se um pico com máximo em 533,4 eV para VB e picos ligeiramente deslocados para 533,3 eV e 532,9 eV e achatados para as amostras VB05Co e VB1Co, respectivamente. Oxigênios não-ligantes na estrutura de sílica são geralmente observados em menores valores de energia de ligação, dessa forma a incorporação do cobalto como modificador de rede no material pode resultar no comportamento observado, corroborando os resultados apresentados anteriormente para o Si 2p (DALBY *et al.*, 2007; NESBITT *et al.*, 2011). Além disso, átomos de oxigênio presentes na estrutura cristalina do Co_3O_4 também são observados em menores valores de energia de ligação e,

portanto, podem contribuir para o deslocamento do pico de O 1s para menores valores de energia (DUPIN *et al.*, 2000).

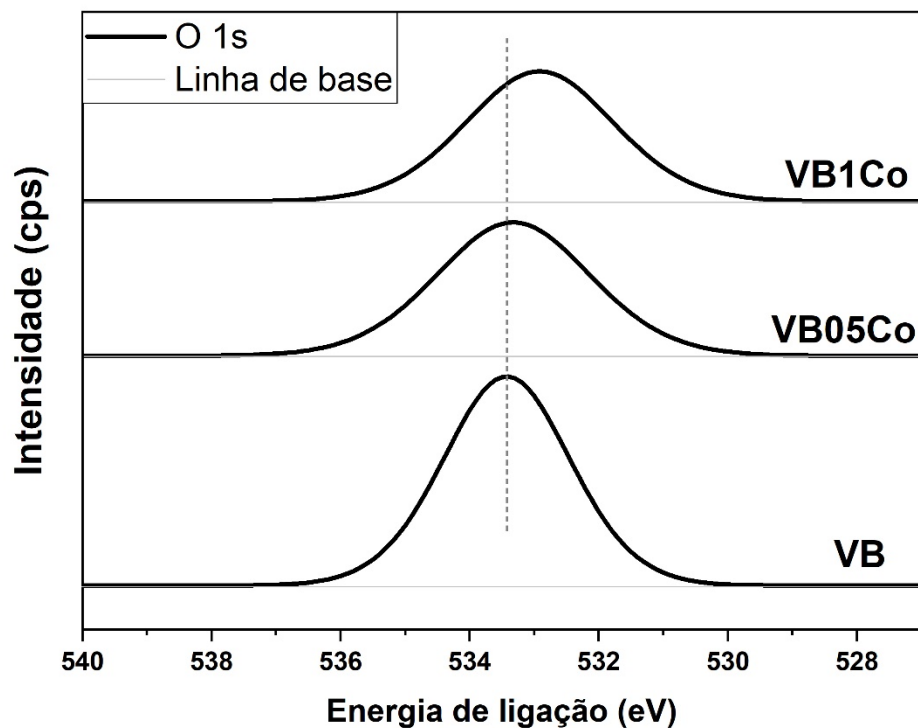


Figura 5.8: Espectro de alta resolução O 1s das amostras VB, VB05Co e VB1Co

Na figura 5.9 estão apresentados os espectros de alta resolução Co 2p para as três amostras de vidro.

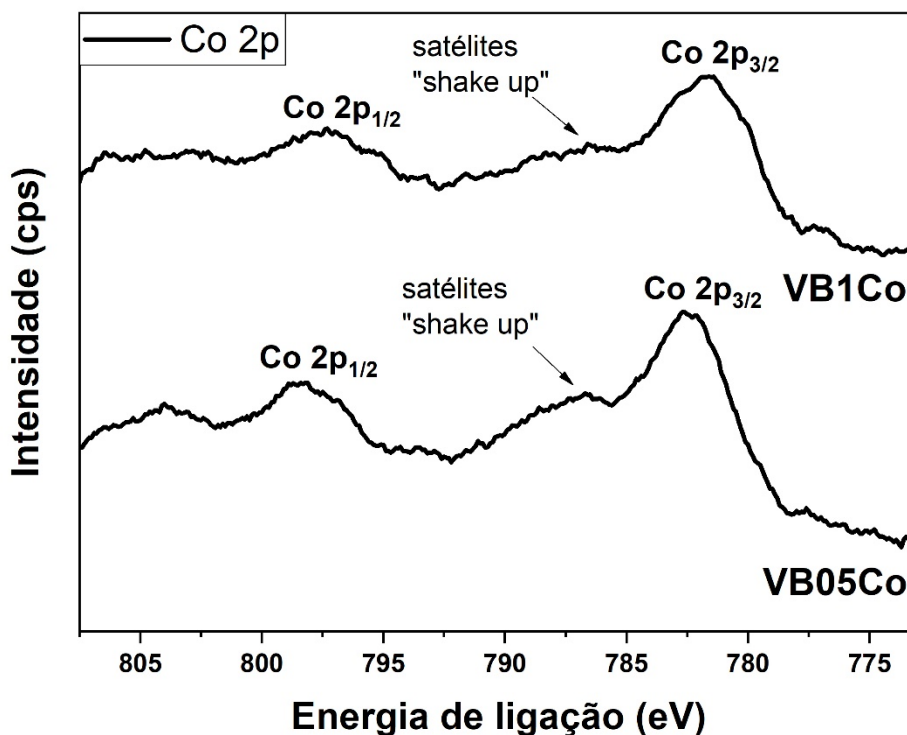


Figura 5.9: Espectro de alta resolução Co 2p das amostras VB05Co e VB1Co

O cobalto pode ser incorporado à estrutura do vidro como Co^{3+} e Co^{2+} , porém em trabalhos recentes que utilizaram metodologias semelhantes para a preparação de nanopartículas de vidro bioativo contendo cobalto, verificou-se que o metal é predominantemente incorporado como Co^{2+} (BARRIONI *et al.*, 2021; EL-FIQI; KIM, 2021). Nos espectros de alta resolução Co 2p, mostrados na Figura 5.6, foram observados picos que podem ser atribuídos às espécies Co^{2+} e Co^{3+} , tanto para a amostra VB05Co, quanto para VB1Co. Essas espécies de Co foram incorporadas à rede vítrea e também estão contidas na fase cristalina de Co_3O_4 na superfície da partícula. É possível distinguir entre os estados de oxidação do cobalto através de estruturas satélite do espectro de Co 2p, bem como através dos valores de energia de ligação associados aos picos XPS (CHUANG; BRUNDLE; RICE, 1976; TIAN *et al.*, 2011). Picos satélite “shake-up” pronunciados podem ser atribuídas a espécies

de Co^{2+} e não podem ser observados no espectro de Co^{3+} 2p. O óxido de cobalto (II,III), que está presente em ambas as amostras, é um composto de valência mista de Co^{2+} e Co^{3+} , portanto, as estruturas satélite devem ser observáveis, porém em menor intensidade (CHUANG; BRUNDLE; RICE, 1976). Além disso, a diferença de energia de ligação entre os picos $\text{Co } 2p^{1/2}$ e $\text{Co } 2p^{3/2}$ é menor para espécies Co^{3+} (15,0 – 15,5 eV) quando comparadas às espécies Co^{2+} (15,7 – 16,0 eV) e as energias de ligação são também menores para as espécies Co^{3+} (BARRIONI *et al.*, 2021; BIESINGER *et al.*, 2011). Para a amostra VB05Co, foram observados um par de picos em aproximadamente 782 eV e 798 eV com uma diferença de energia de ligação entre eles de 16eV e estruturas satélite "shake-up" muito pronunciadas, o que é indicativo de uma proporção mais elevada de espécies Co^{2+} .

Já para a amostra VB1Co, foram observados picos ligeiramente deslocados para valores menores de energia de ligação, em 781,7 eV e 797,3 eV, com uma menor separação entre eles, de 15,6 eV. Estruturas satélite "shake-up" menos pronunciadas também foram observadas, o que sugere que as espécies Co^{2+} estão presentes, mas que há uma maior proporção de espécies de Co^{3+} , se comparada a amostra VB05Co. Considerando que o óxido de cobalto (II,III) está presente em ambas as amostras, conforme indicado pelas análises de FTIR e DRX, a maior proporção de íons Co^{3+} na amostra VB1Co indica que o Co_3O_4 também está presente em maior proporção. Isso provavelmente está relacionado à maior razão molar Si:Co usada para amostras de VB1Co. Trabalhos anteriores que empregaram um método semelhante para incorporação de cálcio em nanopartículas de VB mostraram que existe uma razão molar ótima para incorporação de cálcio, e concentrações mais altas não resultaram em vidros com maior teor de Ca (GREASLEY *et al.*, 2016). Portanto, é possível que, para amostras de BG1Co, a razão molar ótima foi excedida e os íons de cobalto em excesso não foram incorporados à rede de vidro, sendo convertidos a Co_3O_4 .

Assim, a análise XPS indicou que o cobalto foi incorporado à rede vítrea majoritariamente como Co^{2+} , enquanto que o Co_3O_4 na superfície das partículas é

responsável pela presença de Co^{3+} . Os espectros de Si 2p e O 1s indicaram que o Co atua como um modificador de rede, aumentando o número de unidades NBO. Essa ruptura da rede de sílica leva a vidros que apresentam maiores taxas de dissolução, o que impacta positivamente a bioatividade do material e a liberação de íons terapêuticos (BRAUER, 2015).

5.4 Liberação Iônica em PBS

As concentrações iônicas de Si e Co em PBS medidas por ICP-OES em diferentes períodos de tempo (0, 4, 8 e 24h e 3, 7 e 14d) estão apresentadas na Figura 5.10. O PBS foi selecionado para o estudo de liberação de íons para evitar interferências da formação de apatita e por ser uma solução com força iônica e pH similares às do sangue (BEJARANO *et al.*, 2020; MEI, NANXUAN *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2013). Uma amostra de controle, sem partículas adicionadas à solução de PBS, também foi analisada no mesmo período de tempo para avaliar quaisquer alterações na concentração dos elementos em solução. Como era esperado, os íons Si e Co permaneceram indetectáveis durante o experimento.

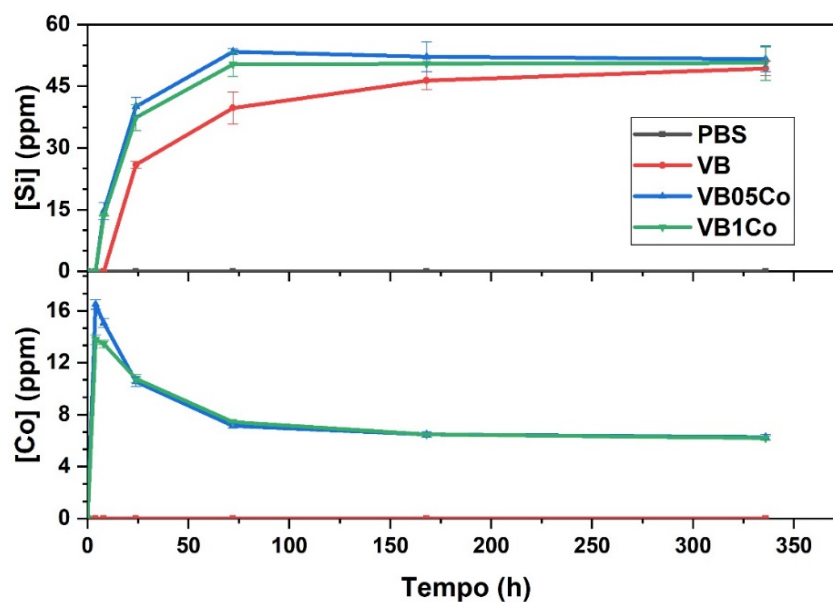


Figura 5.10: Perfil de liberação de íons Si e Co de VB, VB05Co e VB1Co e amostra controle de PBS

Todas as amostras apresentaram um perfil de liberação de Si semelhante, em que as concentrações de Si aumentaram rapidamente nas primeiras 24h, depois mais gradualmente nos dias seguintes. Para amostras contendo Co, a concentração de Si estabilizou no dia 3, atingindo um pico entre 50 e 52 ppm. Para a amostra VB, a concentração de Si aumentou até o dia 14, atingindo um máximo de 50 ppm. Trabalhos anteriores mostraram que a liberação de sílica pode auxiliar na regulação do comportamento celular, aumentar a proliferação de cardiomiócitos e favorecer a biocompatibilidade (BARRIONI *et al.*, 2018; SHI; CAO; *et al.*, 2021). Vale ressaltar que a liberação de Si para amostras contendo Co foi mais rápida, indicando que VB05Co e VB1Co apresentaram uma taxa de dissolução maior que VB, corroborando os resultados de XPS que indicaram que o cobalto foi parcialmente incorporado na estrutura do vidro como modificador da rede, desestruturando a rede vítrea e conseqüentemente aumentando a taxa de dissolução do vidro.

VB05Co e VB1Co também apresentaram perfis de liberação de Co semelhantes, em que as concentrações de Co aumentaram acentuadamente nas primeiras horas de imersão, atingindo picos de 16,5 ppm e 13,8 ppm, respectivamente, e então começaram a declinar, estabilizando em uma concentração final de 6,2 ppm após 14 dias para ambas as amostras. Esse declínio na concentração provavelmente está relacionado à alta afinidade do Co pelos íons fosfato presentes na solução de PBS, o que leva à formação de complexos insolúveis que precipitam até que um estado de equilíbrio seja alcançado (MEI, NANXUAN *et al.*, 2019). A concentração final de Co está dentro do intervalo terapêutico relatado anteriormente, de 3-14 ppm, necessário para a ativação da via HIF-1 α (BARRIONI *et al.*, 2021; RAJA *et al.*, 2019). Trabalhos anteriores relataram que *scaffolds* contendo vidro bioativo capazes de liberar íons Co²⁺ em concentrações entre 8-51 ppm durante um período de 7 dias foram capazes de induzir um aumento na expressão de VEGF em linhagens celulares humanas SAOS-2 e THP-1, além de estimular a formação de estruturas tubulares características de formações neovasculares em células HUVEC (RAJA *et al.*, 2019). DE LAIA *et al.* (2021) também demonstrou que vidros bioativos com uma liberação controlada de Co foram capazes de estimular a expressão de fatores pró-angiogênicos em ensaios *in vitro* e *in vivo*. No entanto, uma liberação inicial rápida pode induzir toxicidade celular, já que trabalhos anteriores relataram uma diminuição na viabilidade celular após exposição a concentrações de Co de 10 ppm após um período de 72 horas (FLEURY *et al.*, 2006). A taxa de dissolução e a cinética de liberação iônica das nanopartículas de VB podem ser significativamente controlados pela incorporação em uma matriz polimérica e a explosão inicial de liberação de íons pode ser reduzida (BOCCACCINI *et al.*, 2010; EL-FIQI; KIM, 2021). Portanto, nanopartículas densas de VB contendo cobalto podem também ser incorporadas a matrizes poliméricas, proporcionando uma liberação controlada de cobalto, possibilitando seu emprego em aplicações na engenharia de tecidos cardíacos, bem como para reparação tecidual.

5.5 Análise de viabilidade celular por MTT

Um ensaio de citotoxicidade *in vitro* é um passo importante na avaliação da segurança das partículas para aplicações biomédicas (VICENTE *et al.*, 2017). Nesse trabalho, a viabilidade de células HUVEC, quando tratadas com o produto iônico da dissolução das nanopartículas de VB, foram avaliadas por MTT. As células HUVEC foram selecionadas para este estudo já que células endoteliais desempenham um papel importante na formação de novos vasos sanguíneos (LAMALICE; LE BOEUF; HUOT, 2007). Além disso, essas células são frequentemente usadas como modelos *in vitro* para o estudo do processo de angiogênese (HARO DURAND *et al.*, 2017; RAJA *et al.*, 2019). A Figura 5.11 mostra os resultados do ensaio de MTT para todas as amostras após 24h, 48h e 72h de contato com o produto de dissolução iônica das nanopartículas densas. Os resultados indicam que a viabilidade celular foi mantida em níveis elevados, acima de 80%, para todos os períodos de tempo a concentrações de nanopartículas de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando boa biocompatibilidade celular. Uma queda mais significativa na viabilidade celular foi observada para amostras de VB05Co a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 48 e 72h, o que pode estar relacionado a maiores concentrações de Co liberadas no meio. Trabalhos anteriores mostraram que as micropartículas de VB contendo cobalto não apresentaram citotoxicidade para células HUVEC em concentrações de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 72 horas, porém os teores de cobalto eram menores (BARRIONI *et al.*, 2018). Um ensaio semelhante foi realizado com nanopartículas de VB contendo estrôncio em células de linhagens pré-osteoblásticas, em que a citotoxicidade foi significativa para concentrações superiores a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (NARUPHONTJIRAKUL; PORTER; JONES, 2018). As partículas de VB05Co e VB1Co se mostraram viáveis para um faixa de concentração superior. Portanto, esses resultados indicam que nanopartículas densas contendo Co podem ser usadas, em concentrações adequadas, sem toxicidade celular significativa como meio para a liberação de fatores pró-angiogênicos.

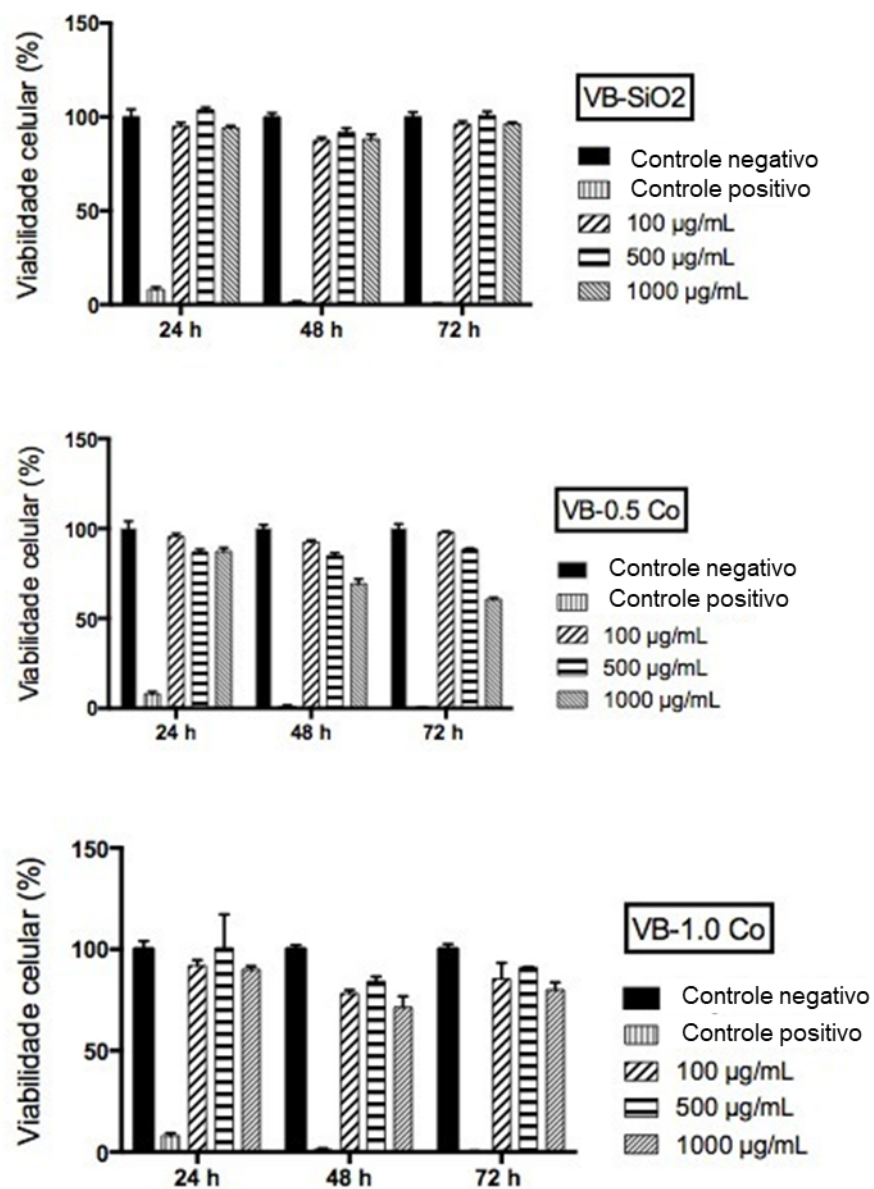


Figura 5.11: Viabilidade celular das amostras VB, VB05Co e VB1Co por MTT após 24h, 48h e 72h.

6. CONCLUSÕES

Nesse trabalho, novas composições de vidros bioativos nanométricos foram obtidas a partir do processo sol-gel em um sistema binário com a incorporação de cobalto, um íon com potencial efeito terapêutico pró-angiogênico para possível aplicação na engenharia e reparo de tecidos cardíacos. A análise da composição química confirmou a presença de cobalto no sistema, até uma concentração máxima de $11,1 \pm 0,4\%$ em mol. A morfologia esférica e nanométrica das partículas foi confirmada por MET, e diâmetros na faixa de 63 a 66 nm foram obtidos. Observou-se ainda a deposição de uma fase extra na superfície das partículas, constituída de Co_3O_4 , como confirmado por análises de FTIR e DRX. As análises de FTIR e DRX indicaram ainda que a estrutura predominantemente amorfa do vidro se manteve com a incorporação de Co. Além disso, confirmou-se a incorporação do cobalto à rede vítrea como um modificador de rede, na forma Co^{2+} , a partir das análises de XPS. A avaliação da liberação iônica em PBS indicou uma liberação controlada de Si e uma liberação inicialmente rápida de Co no meio, mas com concentrações finais dentro dos valores terapêuticos citados na literatura. E, finalmente, a citocompatibilidade das partículas com HUVECS foi confirmada para concentrações de até $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para todas as amostras através de ensaios por MTT. Comparando-se as diferentes composições contendo cobalto avaliadas, observou-se um menor teor de óxido de cobalto na amostra VB05Co e uma pequena variação na concentração de cobalto incorporado, de forma que essa composição seria a mais indicada para trabalhos subsequentes. O cobalto incorporado ao VB atua como um modificador de rede e ao ser liberado durante a dissolução tem capacidades bem documentadas de estímulo a angiogênese, enquanto que o óxido de cobalto(II,III) apresenta propriedades antioxidantes moderadas. Dessa forma, as partículas obtidas tem potencial para serem aplicadas na engenharia de tecidos cardíacos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo por ^{29}Si NMR para confirmação da incorporação de Co na rede vítrea.
- Testar novas composições nominais de precursores de Co para avaliação da incorporação do metal à rede de silicato e a concomitante deposição de óxidos na superfície da partícula.
- Introdução das partículas de VB em uma matriz polimérica porosa constituída de, por exemplo, PCL para obtenção de *scaffolds*.
- Realização de ensaios biológicos *in-vitro* para avaliação da capacidade das nanopartículas de VB de promover a liberação de fatores pró-angiogênicos.
- Realização de ensaios biológicos *in-vivo* para avaliação da resposta fisiológica às partículas e seu potencial angiogênico.
- Avaliar a interação das nanopartículas de VB com cardiomiócitos e a sua atuação sobre tecidos cardíacos danificados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, Banzeer Ahsan *et al.* Phytofabrication of cobalt oxide nanoparticles from *Rhamnus virgata* leaves extract and investigation of different bioactivities. *Microscopy Research and Technique*, v. 84, n. 2, p. 192–201, 2021.

AHADIAN, Samad *et al.* Moldable elastomeric polyester-carbon nanotube scaffolds for cardiac tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 52, p. 81–91, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.009>>.

AZEVEDO, M. M. *et al.* Synthesis and characterization of hypoxia-mimicking bioactive glasses for skeletal regeneration. *Journal of Materials Chemistry*, v. 20, n. 40, p. 8854–8864, 2010.

BAHEIRAEI, Nafiseh *et al.* Synthesis, characterization and antioxidant activity of a novel electroactive and biodegradable polyurethane for cardiac tissue engineering application. *Materials Science and Engineering C*, v. 44, p. 24–37, 2014.

BAINO, Francesco; HAMZEHLU, Sepideh; KARGOZAR, Saeid. Bioactive glasses: Where are we and where are we going? *Journal of Functional Biomaterials*, v. 9, n. 1, 2018.

BARABADI, Zahra *et al.* Fabrication of hydrogel based nanocomposite scaffold containing bioactive glass nanoparticles for myocardial tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, v. 69, p. 1137–1146, 2016.

BARRIONI, Breno R. *et al.* Cobalt-containing spherical glass nanoparticles for therapeutic ion release. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 105, n. 3, p. 1765–1777, 2021.

BARRIONI, Breno R. *et al.* Effects of manganese incorporation on the morphology, structure and cytotoxicity of spherical bioactive glass nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 547, p. 382–392, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.04.016>>.

BARRIONI, Breno R. *et al.* The influence of cobalt incorporation and cobalt precursor selection on the structure and bioactivity of sol-gel-derived bioactive glass. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 88, n. 2, p. 309–321, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10971-018-4823-7>>.

BARRIONI, Breno Rocha *et al.* Evaluation of in vitro and in vivo biocompatibility and structure of cobalt-releasing sol-gel bioactive glass. *Ceramics International*, v. 44, n. 16, p. 20337–20347, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.08.022>>.

BARRIONI, Breno Rocha. *Síntese e caracterização estrutural e biológica de vidros bioativos com capacidade de liberação controlada de íons metálicos Mn e Co com potencial efeito terapêutico osteogênico e angiogênico para aplicações na engenharia de tecidos*. 2018. 121 f. UFMG, 2018.

BARRIONI, Breno Rocha; DE OLIVEIRA, Agda Aline Rocha; DE MAGALHÃES PEREIRA, Marivalda. *The evolution, control, and effects of the compositions of bioactive glasses on their properties and applications*. [S.l: s.n.], 2016. v. 53.

BEHFAR, Atta *et al.* Cell therapy for cardiac repair-lessons from clinical trials. *Nature Reviews Cardiology*, v. 11, n. 4, p. 232–246, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2014.9>>.

BEJARANO, Julian *et al.* Effect of Cu-and Zn-doped bioactive glasses on the in vitro bioactivity, mechanical and degradation behavior of biodegradable PDLLA scaffolds. *Materials*, v. 13, n. 13, 2020.

BELAIDI, Elise *et al.* Delayed myocardial preconditioning induced by cobalt chloride in the rat: HIF-1 α and iNOS involvement. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, v. 26, n. 4, p. 454–462, 2012.

BIESINGER, Mark C. *et al.* Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni. *Applied Surface Science*, v. 257, n. 7, p. 2717–2730, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.10.051>>.

BOCCACCINI, Aldo R. *et al.* Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review. *Composites Science and Technology*, v. 70, n. 13, p. 1764–1776, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.compscitech.2010.06.002>>.

BRAND, Thomas. Heart development: Molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Developmental Biology*, v. 258, n. 1, p. 1–19, 2003.

BRAUER, Delia S. Bioactive glasses - Structure and properties. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 54, n. 14, p. 4160–4181, 2015.

BRINKER, J.; SCHERER, G. *Sol-gel science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. [S.l.: s.n.], 1990.

BROCKNER, Wolfgang; EHRHARDT, Claus; GJIKAJ, Mimoza. Thermal decomposition of nickel nitrate hexahydrate, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, in comparison to $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. *Thermochimica Acta*, v. 456, n. 1, p. 64–68, 2007.

BRUŽAUSKAITĖ, Ieva *et al.* Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects. *Cytotechnology*. [S.l.: s.n.], 2016

CABANAS-POLO, Sandra; BOCCACCINI, Aldo R. Understanding Bioactive Glass Powder Suspensions for Electrophoretic Deposition of Bioactive Glass-Polymer Coatings. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 162, n. 11, p. D3077–D3083, 2015.

CHAI, Yoke Chin *et al.* Fine-tuning pro-angiogenic effects of cobalt for simultaneous enhancement of vascular endothelial growth factor secretion and implant neovascularization. *Acta Biomaterialia*, v. 72, p. 447–460, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.048>>.

CHANDIKA, Pathum *et al.* Recent advances in biological macromolecule based tissue-engineered composite scaffolds for cardiac tissue regeneration applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 164, p. 2329–2357, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.054>>.

CHAUDHURI, Rusha *et al.* Biomaterials and cells for cardiac tissue engineering: Current choices. *Materials Science and Engineering C*, v. 79, p. 950–957, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.121>>.

CHEN, Qi Zhi *et al.* Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue. *Biomaterials*, v. 29, n. 1, p. 47–57, 2008.

CHEN, Qizhi *et al.* Elastomeric nanocomposites as cell delivery vehicles and cardiac support devices. *Soft Matter*, v. 6, n. 19, p. 4715–4726, 2010.

CHEN, Si *et al.* Electrospun PCL Fiber Mats Incorporating Multi-Targeted B and Co Co-Doped Bioactive Glass Nanoparticles for Angiogenesis. *Materials*, v. 13, n. 18, p. 4010, 10 set. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1996-1944/13/18/4010>>. Acesso em: 5 mar. 2021.

CHUANG, T. J.; BRUNDLE, C. R.; RICE, D. W. Interpretation of the x-ray photoemission spectra of cobalt oxides and cobalt oxide surfaces. *Surface Science*, v. 59, n. 2, p. 413–429, 1976.

COHRS, Nicholas H. *et al.* Bioactive glass containing silicone composites for left ventricular assist device drivelines: role of Bioglass 45S5® particle size on mechanical properties and cytocompatibility. *Journal of Materials Science*, v. 52, n. 15, p. 9023–9038, 2017.

CORMACK, A. N.; TILOCCA, A. Structure and biological activity of glasses and ceramics. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 370, n. 1963, p. 1271–1280, 2012.

DALBY, Kim N. *et al.* Resolution of bridging oxygen signals from O 1s spectra

of silicate glasses using XPS: Implications for O and Si speciation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 71, n. 17, p. 4297–4313, 2007.

DATTOLA, Elisabetta *et al.* Development of 3D PVA scaffolds for cardiac tissue engineering and cell screening applications. *RSC Advances*, v. 9, n. 8, p. 4246–4257, 2019.

DE LAIA, Andréia Grossi Santos *et al.* Cobalt-containing bioactive glass mimics vascular endothelial growth factor A and hypoxia inducible factor 1 function. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 109, n. 7, p. 1051–1064, 2021.

DE OLIVEIRA, Agda Aline Rocha *et al.* Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications. *Biomedical Materials (Bristol)*, v. 8, n. 2, 2013.

DOOSTMOHAMMADI, Ali *et al.* Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential. *Ceramics International*, v. 37, n. 7, p. 2311–2316, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.03.026>>.

DUBEY, Shikha *et al.* Facile and green synthesis of highly dispersed cobalt oxide (Co₃O₄) nano powder: Characterization and screening of its eco-toxicity. *Advanced Powder Technology*, v. 29, n. 11, p. 2583–2590, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.appt.2018.03.009>>.

DUPIN, Jean Charles *et al.* Systematic XPS studies of metal oxides, hydroxides and peroxides. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 2, n. 6, p. 1319–1324, 2000.

DVIR, Tal *et al.* Prevascularization of cardiac patch on the omentum improves its therapeutic outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 35, p. 14990–14995, 2009.

EGHBALI, Mahboubeh; WEBER, Karl T. Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 96, n. 1, p. 1–14, 1990.

EL-FIQI, Ahmed *et al.* Capacity of mesoporous bioactive glass nanoparticles to deliver therapeutic molecules. *Nanoscale*, v. 4, n. 23, p. 7475–7488, 2012.

EL-FIQI, Ahmed; KIM, Hae-Won. Sol-gel synthesis and characterization of novel cobalt ions-containing mesoporous bioactive glass nanospheres as hypoxia and ferroptosis-inducing nanotherapeutics. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 569, n. April, p. 120999, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2021.120999>>.

ENDOH, Hiroshi *et al.* Improved cardiac contractile functions in hypoxiareoxygenation in rats treated with low concentration Co²⁺. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 279, n. 6 48-6, p. 2713–2719, 2000.

EROL-TAYGUN, Melek; ZHENG, Kai; BOCCACCINI, Aldo R. Nanoscale Bioactive Glasses in Medical Applications. *International Journal of Applied Glass Science*, v. 4, n. 2, p. 136–148, 2013.

FEINER, Ron; SHAPIRA, Assaf; DVIR, Tal. *Scaffolds for tissue engineering of functional cardiac muscle*. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102563-5.00032-0>>.

FLEURY, Cyrille *et al.* Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: Morphology, cytotoxicity, and oxidative stress. *Biomaterials*, v. 27, n. 18, p. 3351–3360, 2006.

GHADI, Fereshteh Ezzati; GHARA, Abdollah Ramzani; NAEIMI, Atena. Phytochemical fabrication, characterization, and antioxidant application of copper and cobalt oxides nanoparticles using *Sesbania sesban* plant. *Chemical Papers*, v. 72, n. 11, p. 2859–2869, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11696-018-0506-7>>.

GREASLEY, Sarah L. *et al.* Controlling particle size in the Stöber process and incorporation of calcium. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 469, p. 213–

223, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.01.065>>.

HALLIWELL, B. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, v. 16, n. 1, p. 33–50, 1996.

HARO DURAND, Luis A. *et al.* In vitro human umbilical vein endothelial cells response to ionic dissolution products from lithium-containing 45S5 bioactive glass. *Materials*, v. 10, n. 7, 2017.

HENCH, L. L. *et al.* Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 5, n. 6, p. 117–141, 1971.

HENCH, Larry L. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 17, n. 11, p. 967–978, 2006.

HENCH, Larry L.; WEST, J O N K. The Sol-Gel Process. *Chemical Reviews*, v. 90, p. 33–72, 1990.

HIRT, Marc N.; HANSEN, Arne; ESCHENHAGEN, Thomas. Cardiac tissue engineering : State of the art. *Circulation Research*, v. 114, n. 2, p. 354–367, 2014.

HOPPE, Alexander *et al.* Cobalt-releasing 1393 bioactive glass-derived scaffolds for bone tissue engineering applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 6, n. 4, p. 2865–2877, 2014.

HOPPE, Alexander *et al.* In vitro cell response to Co-containing 1393 bioactive glass. *Materials Science and Engineering C*, v. 57, p. 157–163, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.014>>.

HOPPE, Alexander; MOURIÑO, Viviana; BOCCACCINI, Aldo R. Therapeutic inorganic ions in bioactive glasses to enhance bone formation and beyond. *Biomaterials Science*, v. 1, n. 3, p. 254–256, 2013.

HUYER, Locke Davenport *et al.* Biomaterial based cardiac tissue engineering and its applications. *Biomedical Materials (Bristol)*, v. 10, n. 3, 2015.

IQBAL, Javed *et al.* Biogenic synthesis of green and cost effective cobalt oxide

nanoparticles using *Geranium wallichianum* leaves extract and evaluation of in vitro antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and enzyme inhibition properties. *Materials Research Express*, v. 6, n. 11, 2019.

IZQUIERDO-BARBA, Isabel; SALINAS, Antonio J.; VALLET-REGÍ, María. Bioactive Glasses: From Macro to Nano. *International Journal of Applied Glass Science*, v. 4, n. 2, p. 149–161, 2013.

JONES, Julian R. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, v. 23, n. S, p. S53–S82, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.019>>.

KARBASSI, Elaheh *et al.* Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nature Reviews Cardiology*, v. 17, n. 6, p. 341–359, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41569-019-0331-x>>.

KARGOZAR, Saeid *et al.* Bioactive Glasses: Sprouting Angiogenesis in Tissue Engineering. *Trends in Biotechnology*, v. 36, n. 4, p. 430–444, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.12.003>>.

KARGOZAR, Saeid *et al.* “Hard” ceramics for “Soft” tissue engineering: Paradox or opportunity? *Acta Biomaterialia*, v. 115, p. 1–28, 2020.

KARGOZAR, Saeid; HAMZEHLU, Sepideh; BAINO, Francesco. Potential of bioactive glasses for cardiac and pulmonary tissue engineering. *Materials*, v. 10, n. 12, p. 1–17, 2017.

KAUR, Gurbinder *et al.* Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges. *Materials Science and Engineering C*, v. 104, n. December 2018, p. 109895, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109895>>.

KHALIL, Ali Talha *et al.* Physical properties, biological applications and biocompatibility studies on biosynthesized single phase cobalt oxide (Co₃O₄) nanoparticles via *Sageretia thea* (Osbeck.). *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, n.

1, p. 606–619, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.07.004>>.

KOCICA, Mladen J. *et al.* The Helical Ventricular Myocardial Band of Torrent-Guasp. *Pediatric Cardiac Surgery Annual*, v. 10, n. 1, p. 52–60, 2007.

LABBAF, Sheyda *et al.* Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro. *Biomaterials*, v. 32, n. 4, p. 1010–1018, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.082>>.

LAMALICE, Laurent; LE BOEUF, Fabrice; HUOT, Jacques. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation Research*, v. 100, n. 6, p. 782–794, 2007.

LEE, Min-Jae; SUNG, A.-Young. Characterization and Compatibility of High Oxygen Permeable Ophthalmic Biomaterial Containing Silane with Cobalt Oxide Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 20, n. 11, p. 6954–6958, 2020.

LEI, Bo *et al.* Unique physical-chemical, apatite-forming properties and human marrow mesenchymal stem cells (HMSCs) response of sol-gel bioactive glass microspheres. *Journal of Materials Chemistry*, v. 21, n. 34, p. 12725–12734, 2011.

LI, Shengwen Calvin *et al.* Stem cell engineering for treatment of heart diseases: Potentials and challenges. *Cell Biology International*, v. 33, n. 3, p. 255–267, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.11.009>>.

LIVERANI, Liliana *et al.* Incorporation of bioactive glass nanoparticles in electrospun PCL/chitosan fibers by using benign solvents. *Bioactive Materials*, v. 3, n. 1, p. 55–63, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.003>>.

LONG, Jennifer L.; TRANQUILLO, Robert T. Elastic fiber production in cardiovascular tissue-equivalents. *Matrix Biology*, v. 22, n. 4, p. 339–350, 2003.

LUISETTO, Igor; PEPE, Franco; BEMPORAD, Edoardo. Preparation and characterization of nano cobalt oxide. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 10, n.

SUPPL. 1, p. 59–67, 2008.

LUKOWIAK, Anna *et al.* Bioactive glass nanoparticles obtained through sol–gel chemistry. *Chemical Communications*, v. 49, n. 59, p. 6620–6622, 2013.

LUZ, Gisela M.; MANO, João F. Preparation and characterization of bioactive glass nanoparticles prepared by sol-gel for biomedical applications. *Nanotechnology*, v. 22, n. 49, 2011.

MAÇON, Anthony L.B. *et al.* A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, n. 2, p. 1–10, 2015.

MADDEN, Lauran R. *et al.* Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 34, p. 15211–15216, 2010.

MEI, Nanxuan *et al.* Influence of Biocorona Formation on the Transformation and Dissolution of Cobalt Nanoparticles under Physiological Conditions. *ACS Omega*, v. 4, n. 26, p. 21778–21791, 2019.

MEI, Xuan; CHENG, Ke. Recent Development in Therapeutic Cardiac Patches. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 7, n. November, p. 1–11, 2020.

MEILHAC, Sigolène M. *et al.* Cardiac cell lineages that form the heart. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 4, n. 9, 2014.

MIGUEZ-PACHECO, Valentina; HENCH, Larry L.; BOCCACCINI, Aldo R. Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues. *Acta Biomaterialia*, v. 13, p. 1–15, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.11.004>>.

MISFELD, Martin; SIEVERS, Hans Hinrich. Heart valve macro- and microstructure. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 362, n. 1484, p. 1421–1436, 2007.

MONTAZERIAN, Maziar; DUTRA ZANOTTO, Edgar. History and trends of bioactive glass-ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 104, n. 5, p. 1231–1249, 2016.

MONTERO, Pilar *et al.* Cells, Materials, and Fabrication Processes for Cardiac Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, n. August, 2020.

MONTGOMERY, Miles; ZHANG, Boyang; RADISIC, Milica. Cardiac tissue vascularization: From angiogenesis to microfluidic blood vessels. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, v. 19, n. 4, p. 382–393, 2014.

MOURA, D. *et al.* Development of a bioactive glass-polymer composite for wound healing applications. *Materials Science and Engineering C*, v. 76, p. 224–232, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.037>>.

NADERI, Hojjat; MATIN, Maryam M.; BAHRAMI, Ahmad Reza. Review paper: Critical issues in tissue engineering: Biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 26, n. 4, p. 383–417, 2011.

NARUPHONTJIRAKUL, Parichart *et al.* Human mesenchymal stem cells differentiate into an osteogenic lineage in presence of strontium containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, v. 90, p. 373–392, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.03.038>>.

NARUPHONTJIRAKUL, Parichart *et al.* Monodispersed strontium containing bioactive glass nanoparticles and MC3T3-E1 cellular response. *Biomedical Glasses*, v. 2, n. 1, p. 72–81, 2016.

NARUPHONTJIRAKUL, Parichart; PORTER, Alexandra E.; JONES, Julian R. In vitro osteogenesis by intracellular uptake of strontium containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, v. 66, p. 67–80, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.008>>.

NASSAR, Mostafa Y. Size-controlled synthesis of CoCO₃ and Co₃O₄ nanoparticles by free-surfactant hydrothermal method. *Materials Letters*, v. 94, p. 112–115, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2012.12.039>>.

NESBITT, H. W. *et al.* Bridging, non-bridging and free (O²⁻) oxygen in Na₂O-SiO₂ glasses: An X-ray Photoelectron Spectroscopic (XPS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) study. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 357, n. 1, p. 170–180, 2011.

NG, Kwong Man *et al.* Cobalt chloride pretreatment promotes cardiac differentiation of human embryonic stem cells under atmospheric oxygen level. *Cellular Reprogramming*, v. 13, n. 6, p. 527–537, 2011.

OGLE, Brenda M. *et al.* Distilling complexity to advance cardiac tissue engineering. *Science Translational Medicine*, v. 8, n. 342, 2016.

OKA, Toru; MORITA, Hiroyuki; KOMURO, Issei. Novel molecular mechanisms and regeneration therapy for heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 92, p. 46–51, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.01.028>>.

ORTEGA, Richard *et al.* Low-solubility particles and a Trojan-horse type mechanism of toxicity: The case of cobalt oxide on human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2014.

PEITL, Oscar; LATORRE, Guy P.; HENCH, Larry L. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5 Effect of crystallization on apatite-layer formation of. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 30, p. 509–514, 1996.

PINNA, Alessandra *et al.* Nanocerium provides antioxidant and osteogenic properties to mesoporous silica nanoparticles for osteoporosis treatment. *Acta Biomaterialia*, v. 122, p. 365–376, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.12.029>>.

POK, Seokwon *et al.* A multilayered scaffold of a chitosan and gelatin hydrogel supported by a PCL core for cardiac tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 3, p. 5630–5642, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.032>>.

QI, Quan *et al.* Local intramyocardial delivery of bioglass with alginate hydrogels for post-infarct myocardial regeneration. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 129, n. March, p. 110382, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110382>>.

RAHMAN, Ismail Ab; PADAVETTAN, Vejayakumaran. Synthesis of Silica nanoparticles by Sol-Gel: Size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites a review. *Journal of Nanomaterials*, v. 2012, 2012.

RAJA, Farah N.S. *et al.* The Antimicrobial Efficacy of Hypoxia Mimicking Cobalt Oxide Doped Phosphate-Based Glasses against Clinically Relevant Gram Positive, Gram Negative Bacteria and a Fungal Strain. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, v. 5, n. 1, p. 283–293, 2019.

ROMÁN, J.; PADILLA, S.; VALLET-REGÍ, M. Sol-gel glasses as precursors of bioactive glass ceramics. *Chemistry of Materials*, v. 15, n. 3, p. 798–806, 2003.

SAYED, Mostafa M. *et al.* Enhancing mechanical and biodegradation properties of polyvinyl alcohol/silk fibroin nanofibers composite patches for Cardiac Tissue Engineering. *Materials Letters*, v. 255, p. 126510, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126510>>.

SERRA, J. *et al.* FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 332, n. 1–3, p. 20–27, 2003.

SHI, Miao; ZHAO, Fujian; *et al.* Bioactive glass activates VEGF paracrine signaling of cardiomyocytes to promote cardiac angiogenesis. *Materials Science and Engineering C*, v. 124, n. March, p. 112077, 2021. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112077>>.

SHI, Miao; CAO, Xiaodong; *et al.* The cardioprotective effect and mechanism of bioactive glass on myocardial reperfusion injury. *Biomedical Materials (Bristol)*, v. 16, n. 4, 2021.

SHIEKH, Parvaiz A.; SINGH, Anamika; KUMAR, Ashok. Engineering Bioinspired Antioxidant Materials Promoting Cardiomyocyte Functionality and Maturation for Tissue Engineering Application. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 10, n. 4, p. 3260–3273, 2018.

STÖBER, Werner; FINK, Arthur; BOHN, Ernst. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 26, p. 62–69, 1968.

SUNDNES, Joakim *et al.* Physiological Background. *Computing the Electrical Activity in the Heart*. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 1–19. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-33437-8_1>. Acesso em: 22 fev. 2021.

TAVAKOLIZADEH, Amirhossein *et al.* Investigation of Osteoinductive Effects of Different Compositions of Bioactive Glass Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *ASAIO Journal*, v. 63, n. 4, p. 512–517, 2017.

TENDERA, Michal. How much does Europe invest in the treatment of cardiovascular diseases? *European Heart Journal*, v. 27, n. 13, p. 1521–1522, 2006.

THOMMES, Matthias *et al.* Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 87, n. 9–10, p. 1051–1069, 2015.

TIAN, L. *et al.* Synthesis and characterization of α -cobalt hydroxide nanobelts. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 13, n. 8, p. 3483–3488, 2011.

TUTI, Simonetta; PEPE, Franco. On the catalytic activity of cobalt oxide for the

steam reforming of ethanol. *Catalysis Letters*, v. 122, n. 1–2, p. 196–203, 2008.

VICENTE, Sara *et al.* In vitro evaluation of the internalization and toxicological profile of silica nanoparticles and submicroparticles for the design of dermal drug delivery strategies. *Journal of Applied Toxicology*, v. 37, n. 12, p. 1396–1407, 2017.

VICHERY, Charlotte; NEDELEC, Jean Marie. Bioactive glass nanoparticles: From synthesis to materials design for biomedical applications. *Materials*, v. 9, n. 4, 2016.

WANG, Yan *et al.* Synthesis of Co₃O₄ nanoparticles via the CTAB-assisted method. *Materials Letters*, v. 65, n. 2, p. 222–224, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2010.09.090>>.

WASHINGTON, Kenyatta S.; BASHUR, Chris A. Delivery of antioxidant and anti-inflammatory agents for tissue engineered vascular grafts. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, n. SEP, p. 1–18, 2017.

WU, Chengtie *et al.* Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 33, n. 7, p. 2076–2085, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.042>>.

WU, Chengtie *et al.* Mesoporous bioactive glass scaffolds for efficient delivery of vascular endothelial growth factor. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 28, n. 3, p. 367–374, 2013.

YANG, Lei *et al.* Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*, v. 453, n. 7194, p. 524–528, 2008.

ZHAO, Yimu *et al.* The Role of Tissue Engineering and Biomaterials in Cardiac Regenerative Medicine. *Canadian Journal of Cardiology*, v. 30, n. 11, p. 1307–1322, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2014.08.027>>.

ZHENG, Kai; BOCCACCINI, Aldo R. Sol-gel processing of bioactive glass

nanoparticles: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 249, p. 363–373, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.03.008>>.