



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

Dissertação de Mestrado

**"SÍNTESE SOL-GEL DE *SCAFFOLDS* POROSOS DE VIDRO BIOATIVO
COM ADIÇÃO DE AGENTE POROGÊNICO"**

Autora: Fabiana Barbosa Amaral Pereira Guimarães

Orientadora: Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientadora: Agda Aline Rocha de Oliveira

Belo Horizonte -MG

2016

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

Fabiana Barbosa Amaral Pereira Guimarães

**"SÍNTESE SOL-GEL DE *SCAFFOLDS* POROSOS DE VIDRO BIOATIVO
COM ADIÇÃO DE AGENTE POROGÊNICO"**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia
Metalúrgica, de Materiais e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais**

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientadora: Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientadora: Agda Aline Rocha de Oliveira

Belo Horizonte

2016

Dedico esse trabalho aos meus pacientes, pois foram eles a
inspiração para essa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão à professora Marivalda Magalhães pela orientação e oportunidade de adquirir tantos conhecimentos, pela confiança e amizade desenvolvida durante este período.

Também sou grata à amiga e coorientadora Agda Oliveira pela disponibilidade e ajuda, imprescindíveis para realização deste trabalho.

Agradeço ao professor Hermes de Souza Costa pela atenção com o projeto de pesquisa e aos professores e funcionários do Departamento de Metalurgia e de Materiais pela disposição, paciência e incentivo fundamentais para concretização desta etapa.

Os companheiros de laboratório foram de suma importância para mim, com ajuda constante e amizade.

Aqui também estão presentes: a professora Maria de Fátima Leite, Sandhra Carvalho e Ana Celeste na realização do ensaio de MTT.

Lembro os órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro para execução deste trabalho.

Marco a Quality Centro de Odontologia e toda sua equipe como parte desta conquista.

Encerro meus agradecimentos com a menção do meu amor aos meus pais e a toda minha família, pela confiança e dedicação sempre presentes em minha vida, e à Deus, e ao universo pela oportunidade de crescimento e aprendizagem.

Enfim, foram desafios imprescindíveis para meu aprimoramento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1.....	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
1.2 JUSTIFICATIVA	5
1.3 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
1.3.1 FORMAÇÃO ÓSSEA	7
1.3.2 <i>SCAFFOLDS</i> PARA ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO.....	9
1.3.3 VIDRO BIOATIVO	17
1.3.4 PROCESSAMENTO VIA SOL GEL.....	21
1.3.5 AGENTES POROGÊNICOS	27
CAPÍTULO 2.....	30
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS POR CAPÍTULO:.....	31
CAPÍTULO 3.....	33
3 SELEÇÃO DO AGENTE POROGÊNICO.....	34
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1.1 SÍNTESE DOS <i>SCAFFOLDS</i> COM 100% SiO_2 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES AGENTES POROGÊNICOS.....	35
3.2 RESULTADOS	37

3.2.1 <i>SCAFFOLDS</i> OBTIDOS COM DIFERENTES AGENTES POROGÊNICOS....	37
3.2.2 MEV E EDS DOS <i>SCAFFOLDS</i> OBTIDOS COM DIFERENTES AGENTES POROGÊNICOS.	42
3.3 CONCLUSÕES	52
CAPÍTULO 4.....	54
4 CONFECCÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i> 58S e 100S COM O AGENTE POROGÊNICO ESCOLHIDO E VARIAÇÃO NA TEMPERATURA DE SINTERIZAÇÃO 700 ⁰ C, 800 ⁰ C E 900 ⁰ C.....	55
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.1.1 SÍNTESE DOS <i>SCAFFOLDS</i> DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES COM ADIÇÃO DO AGENTE POROGÊNICO PARAFINA 1	55
4.1.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS <i>SCAFFOLDS</i>	57
4.1.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DOS <i>SCAFFOLDS</i>	58
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
4.2.1 MO, MEV E EDS DOS <i>SCAFFOLDS</i> VB58S E VB100S OBTIDOS COM PARAFINA 1	60
4.2.2 μ CT DOS <i>SCAFFOLDS</i> VB58S E VB100S OBTIDOS COM PARAFINA 1....	69
4.2.3 DRX DOS <i>SCAFFOLDS</i> VB58S E VB100S OBTIDOS COM PARAFINA 1....	73
4.2.3 ADSORÇÃO DE NITROGÊNIO DOS <i>SCAFFOLDS</i> VB58S E VB100S OBTIDOS COM PARAFINA 1	75
4.2.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DOS <i>SCAFFOLDS</i> VB58S E VB100S OBTIDOS COM PARAFINA 1	77
4.3 CONCLUSÕES	80
CAPÍTULO 5.....	82
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
5.1 CONCLUSÕES	83
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	84

CAPÍTULO 6.....	85
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- (a) Imagem μ CT de osso esponjoso removido da articulação proximal do joelho. (b) Fotografia de fêmur humano (JONES, 2013).....	9
Figura 1.2- Imagem de MEV mostrando a estrutura porosa do trabecular ósseo. (a) baixa densidade, (b) densidade superior, (c) densidade intermediária (GERHARDT, 2010).....	9
Figura 1.3- MEV dos <i>scaffolds</i> produzidos pela técnica de inclusão de agentes porogênicos: (a) naftaleno, (b) amido de milho, (c) amido de mandioca, (d) microesferas de polietileno e (e) negro de fumo (CROVACE, 2009).....	13
Figura 1.4- <i>Scaffolds</i> de VB feitos por <i>robocasting</i> (JONES, 2014).....	15
Figura 1.5- MEV das fibras de VB obtidas pela rota sol-gel e <i>electrospun</i> , (a) 100S e (b) 70S30C. A imagem mostra a superfície lisa das fibras 100S e a estrutura de nanoporos da fibra 70S30C (POOLOGASUNDARAMPILLAI <i>et al.</i> , 2014).....	16
Figura 1.6- (a) biomaterial 70S30C, (b) biomaterial inserido no local do dente extraído, (c) colocação do implante, (d) colocação da coroa dental (POOLOGASUNDARAMPILLAI <i>et al.</i> , 2014).....	16
Figura 1.7- Fluxograma mostrando as etapas de reações interfaciais entre o osso e o VB classe A (HENCH, 2014).....	19
Figura 1.8- Esquema mostrando as reações no processo sol-gel: formação de nanopartículas e sílica tetraédrica à temperatura ambiente (JONES, 2013).....	23
Figura 1.9- Rede tridimensional formada pela reação de hidrólise do precursor TEOS, estruturas (a) planar e (b) tridimensional (OLIVEIRA, 2007).....	25
Figura 1.10- Imagem de MEV do arcabouço confeccionado com 82% de parafina (MACHADO <i>et al.</i> , 2009).....	29
Figura 3.1- Recipientes de teflon para confecção dos <i>scaffolds</i>	36
Figura 3.2- MEV da cera, mostrando ampla distribuição de tamanho, com variação de 9 μ m a 204 μ m.....	38
Figura 3.3- MEV do CMC, com distribuição de tamanho de 28 μ m até 382 μ m.....	38
Figura 3.4- MEV da parafina 1, com distribuição de tamanho de 609 μ m até 993 μ m.....	38

Figura 3.5- MEV da parafina 2, com distribuição de tamanho de 1,9mm até 2,3mm.....	39
Figura 3.6- Imagem dos <i>scaffolds</i> de parafina 1 antes do tratamento térmico.....	39
Figura 3.7- Imagem dos <i>scaffolds</i> , (a) parafina 2, (b) CMC mais parafina 1, (c) parafina 1 e (d) cera.....	40
Figura 3.8- Imagem de MEV dos <i>scaffolds</i> produzidos com adição de cera, parafina 1 e parafina 2 tratados termicamente. (a) VBC 900 ⁰ C, com aumento de 100x., (b) VBP1 700 ⁰ C com aumento de 50x e (c).VBP2 800 ⁰ C, com aumento de 400x.....	43
Figura 3.9- EDS do <i>scaffold</i> com adição de cera tratados a 700 ⁰ C.....	44
Figura 3.10- μ CT do VBC 700 ⁰ C: (a) <i>scaffold</i> em 3D, (b) estrutura de poros em 3D, (c) estrutura interna em 3D, (d) corte 2D.....	46
Figura 3.11- μ CT do VBP1 700 ⁰ C: (a) <i>scaffold</i> em 3D, (b) estrutura de poros em 3D, (c) estrutura interna em 3D, (d) corte 2D.....	47
Figura 3.12- μ CT do VBP2 700 ⁰ C: (a) <i>scaffold</i> em 3D, (b) estrutura de poros em 3D, (c) estrutura interna em 3D, (d) corte 2D.....	48
Figura 3.13- Distribuição de tamanho de poros por μ CT: (a) VBC 700 ⁰ C, (b) VBP1 700 ⁰ C e (c) VBP2 700 ⁰ C.....	49
Figura 4.1- Esquema da síntese VB.....	56
Figura 4.2- (a) Imagem, (b) MO, (c), (d) e (e) MEV do VBPI58S-700 ⁰ C.....	61
Figura 4.3- EDS do VBPI58S-700 ⁰ C.....	62
Figura 4.4-(a) Imagem, (b) MO (c) MEV do VBPI58S-800 ⁰ C.....	63
Figura 4.5- EDS do VBPI58S-800 ⁰ C.....	63
Figura 4.6- (a) Imagem de MO, (b) e (c) Imagem de MEV em cortes longitudinais superior, (d) e (e) cortes longitudinais inferior do VBPI58S-900 ⁰ C.....	65
Figura 4.7- EDS do corte longitudinal: (a) superior, (b) inferior, (c) um ponto próxima ao poro do VBPI-900 ⁰ C	66
Figura 4.8 (a) e (b) Imagem com a iluminação do MO, (c) MO e (d) MEV do VBPI100S-700 ⁰ C.....	67
Figura 4.9- (a) Imagem com iluminação do MO, (b) MO do VBPI100-800 ⁰ C.....	68

Figura 4.10- (a) Imagem de MO, (b)MEV do VBPI100-900 ⁰ C.....	68
Figura 4.11- Imagens de μ CT do VBPI58S-700 ⁰ C (a) <i>scaffold</i> , (b) estrutura de poros e (c) estrutura interna.....	70
Figura 4.12- Distribuição de tamanho de poros por μ CT: (a) VBPI58S-700 ⁰ C, (b) VBPI58S-800 ⁰ C e (c) VBPI58S-900 ⁰ C.....	71
Figura 4.13- Distribuição de tamanho de poros por μ CT: (a) VBPI100S-700 ⁰ C, (b) VBPI100S-800 ⁰ C e (c) VBPI100S-900 ⁰ C.....	72
Figura 4.14- DRX dos (a) VBPI58S-700 ⁰ C, VBPI58S-800 ⁰ C e VBPI58S-900 ⁰ C e (b) VBPI100S-700 ⁰ C, VBPI100S-800 ⁰ C e VBPI100S-900 ⁰ C.....	74
Figura 4.15- Atividade metabólica dos osteoblastos primários quando expostos aos materiais por 24 horas: - controle negativo, - controle positivo, - VBPI58S-700 ⁰ C, - VBPI58S-800 ⁰ C, - VBPI58S-900 ⁰ C, - VBPI100S-700 ⁰ C, - VBPI100S-800 ⁰ C e - VBPI100S-900 ⁰ C.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Amostras para seleção dos agentes porogênicos.....	36
Tabela 3.2- Descrição dos <i>Scaffolds</i>	41
Tabela 3.3- Diâmetro e porcentagem de poros abertos (obtidos por μ CT e MEV) dos <i>scaffolds</i> de VB100S com adição dos agentes porogênicos: cera (C), parafina 1(P1), parafina 2(P2), tratados a 700, 800 e 900 ⁰ C e tamanho dos agentes porogênicos.....	51
Tabela 4.1- Amostras dos <i>Scaffolds</i> de VB 58S e 100S.....	57
Tabela 4.2- Diâmetro e porcentagem de poros abertos obtidos por MEV e μ CT dos <i>scaffolds</i> de VB58S e VB100S com adição do agente porogênico parafina 1(P1).....	73
Tabela 4.3- Área superficial específica, volume e diâmetro de poros, determinados por BET- Adsorção de Nitrogênio dos <i>scaffolds</i> de VB58S e VB100S com adição do agente porogênico parafina 1(P1).....	76
Tabela 4.4- Porcentagem de atividade metabólica dos osteoblastos primários quando expostos aos materiais por 24 horas determinados pelo ensaio de MTT dos <i>scaffolds</i> de VB58S e VB100S com adição do agente porogênico parafina 1(P1).....	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2-D	Bidimensional
3CD	Células da terceira passagem de populações aleatórias
3D	Tridimensionais
BET	Brunauer, Emmett e Taller
BJH	Barrett, Joyner e Halenda
CAD	Desenho auxiliado por computador
CMC	Carboximetilcelulose
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DRX	Difração de raio-X
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
FTIR	Espectroscopia do infravermelho
G1	Provém do inglês gap, que significa "intervalo"
G2	Terminada a síntese de DNA, reinicia a produção de RNA
G2-M	Fim do período G2 a célula está em condições de iniciar a mitose
HCA	Hidroxiapatita carbonatada
IB	Índice de bioatividade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MO	Microscopia óptica
MTT	<i>(3-(4,5- Dimethylthiazol)-2,5- diphenyltetrazolium bromide</i> (sal de tetrazólio)
PCZ	Ponto de carga zero
pH	Potencial hidrogeniônico
PIE	Ponto isoelétrico
PVA	Poli(alcool)vinílico
S	Síntese
SA	Área de superfície específica
SBF	Fluido corporal simulado
SFB	Soro fetal bovino

VBC	<i>Scaffold</i> de vidro bioativo com adição de cera como agente porogênico
VBP1	<i>Scaffold</i> de vidro bioativo com adição de parafina 1 como agente porogênico
VBP2	<i>Scaffold</i> de vidro bioativo com adição de parafina 2 como agente porogênico
TEOS	Alcóxido tetraetil ortosilicato
TEP	Trietilfosfato
VB	Vidro bioativo
β - TCP	Beta tricálcio fosfato
μ CT	Microtomografia Computadorizada

RESUMO

O uso de biomateriais capazes de gerar uma resposta biológica tem sido um dos maiores progressos em medicina regenerativa, devido sua habilidade de suportar o crescimento e estimular a regeneração do tecido danificado. Neste contexto, biocerâmicas e, particularmente o vidro bioativo, foram o objetivo de múltiplos estudos devido sua capacidade conhecida de promover ligação entre o tecido e o implante. Desde a descoberta do vidro bioativo em 1970, vários estudos *in vitro* confirmaram a grande compatibilidade, propriedades de osteoindução e osteocondução do material. A técnica de adição de agentes porogênicos para a síntese de *scaffolds* é uma técnica interessante, pois vários tipos de agentes porogênicos podem ser usados. Este estudo propôs obter *scaffolds* através de quatro agentes porogênicos e avaliar os efeitos que a mudança na temperatura de tratamento térmico promovem na sua cristalinidade. O estudo preparou e caracterizou *scaffolds* de vidro bioativo obtidos pela técnica sol-gel 100S (100% SiO₂) mais agentes porogênicos: (I): parafina 1 com média de tamanho de 608,5µm até 993,3µm, (II): parafina 2, com tamanho de 1,929mm até 2,307mm, (III): cera, com tamanho de 9,272µm até 204µm e (IV): CMC (carboxi metil celulose), com tamanho de 27,74µm até 382µm. Como os melhores resultados foram obtidos com parafina 1, *scaffolds* com composição 58S (60%SiO₂-36%CaO-4%P₂O₅) e 100S (100% SiO₂) usando parafina como agente porogênico foram preparados. Os *scaffolds* foram submetidos a diferentes temperaturas de tratamento térmico para avaliar a cristalinidade do material. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou o formato da rede de poros. A micro-tomografia computadorizada (µCT) apresentou o volume 3D dos *scaffolds*, suas características de superfície e rede de poros. Os *scaffolds* apresentaram tamanho de poros superior a 150 µm, distribuição de poros satisfatória e porosidade superior a 50%, características importantes para os *scaffolds* pois permitem migração celular, transporte de nutrientes, vascularização e crescimento tecidual. A difração de raio-X (DRX) constatou a natureza amorfa dos *scaffolds*. A 900°C, *scaffolds* de VB 58S e 100S tiveram um pequeno aumento na sua cristalinidade. As análises de adsorção de N₂ (BET) mostraram estrutura mesoporosa no material com diâmetro de 9,4nm no *scaffold* 100S tratado a 900°C até 22,9nm no *scaffold* 100S tratado a 800°C, a área de superfície específica (SA) variou de 73,2m²/g no *scaffold* 58S tratado a 800°C até

331,2m²/g no *scaffold* 100S tratado a 800⁰C. O material se mostrou não tóxico pelos ensaios de citotoxicidade MTT. Os resultados mostraram que é possível adicionar agentes porogênicos ao VB obtido via sol-gel e obter *scaffolds* com poros interconectados, porosidade, tamanho e distribuição de poros favoráveis a regeneração tecidual óssea.

Palavras-chave: vidro bioativo, agente porogênico, biomateriais, sol-gel, cristalinidade.

ABSTRACT

The use of biomaterials capable of generating a biological response has been one of the biggest progresses in regenerative medicine, due to their ability to support growth stimulation and damaged tissue regeneration. In this context, ceramics and particularly bioactive glass, were the subjects of multiple studies because of their known capacity to promote strong bonds between the tissues and the implant. Since the discovery of bioactive glass in the 1970s, various *in vitro* studies confirmed a high compatibility, osteoconductive and osteoinductive properties of this material. The technique of porogen agent addition for the synthesis of scaffolds is an interesting procedure because several types of porogen agents can be used. The aim of this present work was to obtain scaffolds using four porogen agents and to evaluate the effects that a change in treatment temperature can have on their crystallinity. This study prepared and characterized sol-gel bioactive glass 100S (100% SiO₂) scaffolds more porogen agents: two types of paraffin, (I): paraffin 1, with average size 608.5µm until 993.3µm, (II): paraffin 2, with size 1.929mm until 2.307mm, (III): wax, with size 9.272µm until 204µm and (IV): CMC (carboxy methyl cellulose), with size 27.74µm until 382µm. As the best results were obtained with paraffin 1, scaffolds 58S (60%SiO₂-36%CaO-4%P₂O₅) and 100S (100% SiO₂) using paraffin 1 as porogen agent were prepared. The scaffolds were submitted to different treatment temperatures to evaluate the effect on their crystallinity. The scanning electron micrographs (SEM) showed the porous network shape. Micro-computed tomography (µCT) presented the 3D volume rendering of scaffolds, showing structural characteristics of the scaffold surface and porous network. Scaffolds presented satisfactory pore size and pore size distribution, important characteristics for scaffolds because they allow cell migration, nutrient transport, vascularization and tissue ingrowth. The scaffolds exhibited pore size diameter higher than 150µm, adequate pore distribution and open porosity higher than 50%, which facilitates cell growth, migration and nutrient flow. X-ray powder diffraction (XRD) showed the amorphous nature of the scaffolds. At 900°C, scaffolds BG 58S and 100S showed a small increase in crystallinity. N₂-adsorption (BET) indicated a mesoporous with distribution ranging from 9.4nm in BG 100S with paraffin 1 treated at 900°C to 22.9nm in BG 100S with paraffin 1 treated at 800°C. The specific surface area (SA) varied from

73.2m²/g for scaffold 58S with paraffin 1 treated at 800⁰C to 331.2m²/g for scaffold 100S with paraffin 1 treated at 800⁰C. The materials obtained showed no toxic effects by MTT cytotoxicity assays. Results showed that the development of scaffolds is possible using porogen agents, with 3D interconnected porous structure and might therefore be a potential biomaterial for bone tissue regeneration.

Keywords: bioactive glass, porogen agent, biomaterials, sol-gel, crystallinity.

CAPÍTULO 1

Introdução

Justificativa

Revisão de literatura

1.1 INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa tem avançado com o emprego de biomateriais que suscitam resposta biológica favorável e estimulação do crescimento/regeneração de tecidos danificados. Materiais cerâmicos são objetos de vários estudos, pois apresentam capacidade de promover forte ligação entre o tecido e o dispositivo implantado. Desde a descoberta do vidro bioativo (VB) na década de 70, diversos estudos *in vitro* confirmam a alta biocompatibilidade e propriedades osteocondutoras e osteoindutivas desses materiais (MOREIRA, 2014).

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa têm como objetivo promover a cura e idealmente a regeneração das estruturas teciduais, restabelecendo a função tecidual com previsibilidade, mais rapidamente e de forma menos invasiva em relação às técnicas convencionais. Enxertos ósseos autógenos fornecem uma matriz osteocondutora, além de células e fatores de crescimento. Entretanto, a qualidade do osso autógeno é variada, dependendo da saúde geral do paciente. Muitos pacientes necessitam de um enxerto ósseo superior e em maior quantidade que seu organismo pode oferecer, tais como: pacientes com osteopenia, osteoporose, diabetes, história de fumo (LYNCH *et al.*, 2008).

Pacientes submetidos a tratamento com enxertos autógenos, além da recuperação cirúrgica da área implantada, terão o trauma no local doador, com dois sítios cirúrgicos. A realização destes enxertos, algumas vezes, requer internação hospitalar do paciente para retirar enxerto da crista ilíaca ou calota craniana. Esta internação pode ser evitada com o uso de biomateriais (PINHEIRO & GERBI, 2010).

Os vidros bioativos (VBs) são materiais que possuem capacidade de induzir uma resposta biológica na interface do material, levando à formação de camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA), responsável pela formação de forte ligação entre o material e os tecidos moles e duros (RAHAMAN *et al.*, 2011). O conceito de materiais bioativos formarem ligação com o osso foi sugerido inicialmente por Hench e, desde

então, esses materiais vêm sendo intensamente estudados em variadas composições para aplicações na área biomédica (PEREIRA & HENCH, 2004).

Os componentes principais dos VBs são SiO_2 , CaO , P_2O_5 e Na_2O em proporções específicas. A composição do sistema é um fator determinante para a interação do biomaterial com o tecido, sendo que a mais comum é formada por SiO_2 , CaO e P_2O_5 (RATNER *et al.*, 2004).

Pesquisas recentes tem demonstrado que o VB, na composição 58S (60% SiO_2 -36% CaO -4% P_2O_5 em % molar ou 58% SiO_2 -33% CaO -9% P_2O_5 em % mássico), tratado a 700°C , apesar da grande bioatividade, apresenta taxa de reabsorção muito rápida, não sendo indicado para uso em defeitos ósseos críticos. O defeito ósseo é caracterizado crítico, considerando fatores como tamanho, espécie, idade, localização anatômica da lesão, estabilidade e tipo de fixação dos fragmentos ósseos (ALVES, 2013).

O tratamento térmico e mudanças na composição dos VBs permitem controlar sua velocidade de reabsorção no organismo. Deve ser considerado que nem todas as aplicações dos VBs requerem rápida reação biológica. O aumento do teor de silício diminui a taxa de degradação, sendo este um efeito direto da composição dos VBs. Tratamentos térmicos em elevadas temperaturas tornam esse biomaterial mais cristalino, diminuindo a resposta do organismo ao biomaterial (BELLUCCI *et al.*, 2010).

A obtenção de *scaffolds* macroporosos de VB pela rota da espuma (COELHO, 2003; ALVES, 2013), apesar de apresentar biomateriais com alta porosidade, poros interconectados, com diâmetro médio superior a $150\mu\text{m}$, tem demonstrado difícil reprodutibilidade e dificuldade de obtenção, devido à necessidade de ajuste de vários parâmetros e de controle das condições ambientais. A possibilidade da formação de poros por agentes porogênicos é uma metodologia alternativa proposta nesse trabalho.

A técnica de adição de agentes porogênicos é uma técnica versátil, uma infinidade de agentes porogênicos pode ser utilizada e não foi encontrado na literatura nenhum estudo sobre sua adição ao VB obtido via sol-gel.

Apoiado ao grande potencial dos VBs, este estudo surge com os objetivos de: (i) desenvolver uma nova rota de obtenção de *scaffolds* porosos de VB por adição de agentes porogênicos ao VB obtido via sol-gel (ii) avaliar os efeitos provocados na sua cristalinidade por modificações na composição e mudanças nas temperaturas de tratamento dos *scaffolds* de VB obtidos.

1.2 JUSTIFICATIVA

Um dos desafios da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa é o tratamento de defeitos ósseos críticos, caracterizados por grandes perdas ósseas, incapazes de se regenerarem naturalmente (LYNCH *et al.*, 2008).

A cirurgia ortopédica reconstrutiva se depara com defeitos ósseos por trauma, ressecção de tumores ou doenças ósseas. O tratamento para reparo ósseo envolve tecido doador e implantação de biomaterial. Enxertos ósseos autógenos, alógenos e xenoenxertos tem limitações (GUIMARÃES, 2002). O enxerto ósseo autógeno exige dois sítios cirúrgicos, além de depender da quantidade e qualidade do osso doador do paciente. A vantagem dos substitutos ósseos sintéticos em relação aos enxertos alógenos e xenoenxertos é que eles diminuem o risco de transmissão de doenças. Os biomateriais sintéticos permitem a individualização do material de acordo com a sua aplicação clínica (JENSEN *et al.*, 2010).

O mercado de biomateriais fornece ampla gama de produtos, como alternativas terapêuticas, porém há um desafio: indicar o material mais adequado às necessidades do paciente.

Os VBs, biomaterial sintético, constituem os mais efetivos materiais bioativos já pesquisados, ou seja, aqueles que formam ligações mais pronunciadas com os tecidos vivos. Uma característica das cerâmicas bioativas é a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) na superfície do implante. Esta fase é equivalente em composição e estrutura à fase mineral do osso e é responsável pela ligação interfacial (PEREIRA *et al.*, 2012).

O controle da cristalinidade pela composição e tratamento térmico do VB permite ajustar sua taxa de degradação e bioatividade, favorecendo diferentes aplicações na regeneração óssea (BELLUCCI *et al.*, 2010).

A obtenção de *scaffolds* porosos de VB pela rota da espuma (COELHO, 2003; ALVES, 2013) tem demonstrado difícil reprodutibilidade e dificuldade de obtenção, devido à necessidade de ajuste de vários parâmetros e de controle das condições ambientais. Em particular, destaca-se que o vazamento da espuma no molde é controlado visualmente, o que torna o processo altamente dependente da pessoa que realiza a síntese. A possibilidade da formação de poros por agentes porogênicos adicionados a uma solução precursora obtida pela rota sol-gel é uma metodologia alternativa proposta nesse trabalho, que visa a obtenção de uma estrutura porosa sem a necessidade de formação de espuma durante a síntese. Espera-se, assim, desenvolver uma metodologia de síntese mais simples e mais reprodutível.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 FORMAÇÃO ÓSSEA

Durante a embriogênese, a formação óssea ocorre através de uma complexa série de interações celulares. O tecido ósseo de várias partes do corpo passa por uma fase de formação cartilaginosa e calcificação e então é substituído por osso em um processo conhecido como formação óssea endocondral. Interessantemente, o reparo ósseo no adulto é similar a este processo. Durante o reparo ósseo, muitos fatores de crescimento liberados afetam o processo de regeneração (SCHWARTZ *et al.*, 1997).

Para entendermos a neoformação óssea temos que compreender que as células osteoprogenitoras, isto é, células precursoras de osteoblastos, estão presentes na matriz orgânica da medula óssea, no endóstio e no perióstio que recobre a superfície óssea. Essas células, caracterizadas pela habilidade de formar osso são chamadas de células precursoras osteogênicas (GUIMARÃES, 2002).

Os osteoblastos são caracterizados por uma incapacidade de locomoção e divisão, não sendo capazes de proliferarem para dentro do tecido. A regeneração do defeito dependerá da presença de células precursoras osteogênicas (mesenquimais indiferenciadas) ao redor do osso ou do tecido mole e da sua habilidade para invadir o defeito e se diferenciar em osteoblastos. Também será necessária a presença de um estímulo osteoindutor, para iniciar a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, e a presença de um meio osteocondutor, formando uma matriz sobre a qual o tecido possa proliferar e onde as células osteoprogenitoras estimuladas possam diferenciar em osteoblastos (LANG *et al.*, 1999).

O tecido ósseo atua como um sistema inteligente, as células respondem dinamicamente a estímulos, expressando fatores de crescimento em doses e tempos específicos (JIANG *et al.*, 2002).

Para que ocorra formação de novo osso, as células progenitoras ósseas devem sofrer mitose. Em pessoas idosas, células progenitoras ósseas estão presentes em pequena quantidade e devem receber o estímulo químico correto do ambiente local para iniciar o ciclo celular. O novo ciclo celular inicia quando as células completam a mitose. Se o ambiente químico é adequado, ocorre um período de crescimento na fase G1 e a célula inicia a fase S que é o momento da síntese de DNA com a duplicação de todos os cromossomos no núcleo. Após, inicia-se a fase G2 em que a célula prepara para se dividir e verifica com precisão sua replicação através de enzimas reparadoras de DNA. Para que ocorra a transição para a fase G2-M é necessário um grande aumento de massa, síntese e ativação de vários fatores de crescimento. Se o ambiente químico não permitir que ocorra a fase G1 ou a fase G2, acontecerá a apoptose, que é morte celular programada. Os materiais inertes ou os materiais bioativos classe B não produzem ambiente químico propício para que as poucas células progenitoras ósseas presentes completem o novo ciclo celular. Somente os materiais bioativos classe A permitem que estes eventos ocorram com o rápido resultado de nova formação óssea *in vivo*. A arquitetura 3D do osso mineralizado é criada pelos osteoblastos, quando células são expostas a determinadas concentrações de constituintes iônicos solúveis liberados pelo VB. Aproximadamente 17 a 20ppm de Si solúvel e 88 a 100ppm de íons Ca solúveis são necessários. A principal função dos VB é liberar concentrações críticas de íons biologicamente ativos com taxas necessárias para proliferação e diferenciação celular (HENCH, 2006). A Figura 1.1 mostra a imagem μ CT de osso esponjoso removido da articulação do joelho e uma fotografia de fêmur humano e a Figura 1.2 é imagem de MEV mostrando a estrutura porosa do trabecular ósseo, a cabeça do fêmur, com baixa densidade mostrando os poros abertos, cabeça do fêmur apresentando uma densidade superior e o côndilo femoral, com densidade intermediária, tendo estrutura orientada, poros abertos e interconectados (GERHARDT, 2010).

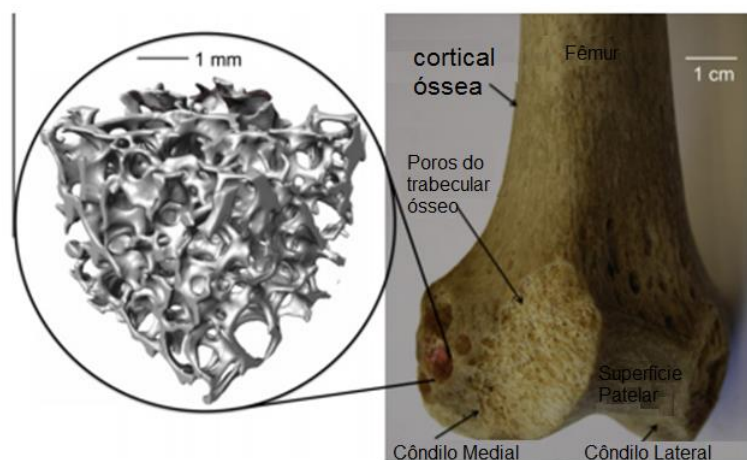


Figura 1.1- (a) Imagem μ CT de osso esponjoso removido da articulação proximal do joelho. (b) Fotografia de fêmur humano (JONES, 2013).

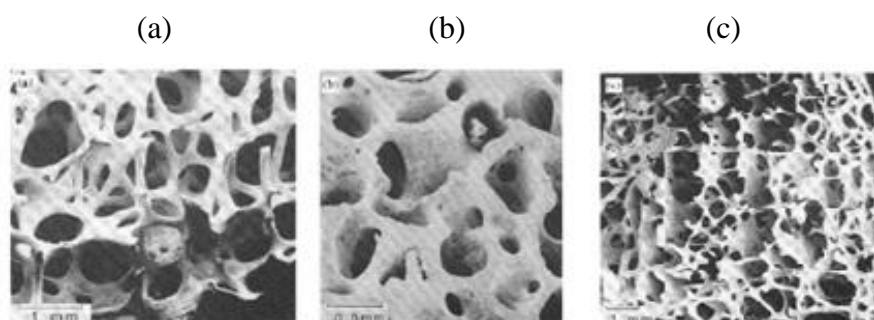


Figura 1.2- Imagem de MEV mostrando a estrutura porosa do trabecular ósseo. (a) baixa densidade, (b) densidade superior, (c) densidade intermediária (GERHARDT, 2010).

1.3.2 SCAFFOLDS PARA ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO

A engenharia de tecidos, para restaurar a função óssea, combina: células funcionais isoladas e *scaffolds* biodegradáveis construídos pela engenharia de biomateriais. Equipes multidisciplinares trabalham no desenvolvimento de *scaffolds* adequados que

funcionem como arcabouços para a adesão e proliferação de células tronco. Várias pesquisas para desenvolvimento desses *scaffolds* estão sendo realizadas *in vitro* e *in vivo*. Uma das maiores promessas de *scaffolds* para aplicação em engenharia de tecidos ósseos são os VBs, devido à bioatividade destes materiais. Várias técnicas citadas a seguir permitem obter *scaffolds* altamente porosos, com estruturas em três dimensões, porosidade adaptada e tamanho de poro e interconectividade adequados (CHEN *et al.*, 2008).

MANGANO (2011), relata que o *scaffold* ideal deve possuir poros abertos, lembrando o Sistema Haversiano, para absorver o sangue e os fatores de crescimento. Deve-se refazer a estrutura do osso, o aspecto repetitivo da célula para que essa relembre o que deve ser feito.

O *scaffold* ideal deverá comandar a regeneração tecidual e remodelação *in vivo*, para tanto, deve ter uma superfície osteocondutora para que ocorra ligação e migração celular. Terá que induzir quimiotaxia (é o nome dado ao processo de locomoção de células em direção a um gradiente químico), estimular proliferação celular e coordenar a síntese de matriz no tecido hospedeiro. A complexidade da resposta celular para sinalização da matriz extracelular fez com que se desenvolvesse *scaffolds* tridimensionais (3D) que imitam as propriedades da matriz extracelular e não atuam apenas como suporte celular e tecidual (OWEN & SHOICHET, 2010).

O *scaffold* deverá guiar a regeneração tecidual e remodelação *in vivo*, com sua superfície osteoindutora, anatomia, tamanho dos poros e morfologia da parede dos poros ideais, porosidade (superior a 50% do volume do biomaterial), área de superfície e interconectividade dos poros, para que ocorra ligação e migração celular. Deveriam ainda ter características moduladas para induzir quimiotaxia, estimular proliferação celular e coordenar a síntese de matriz no tecido hospedeiro.

A técnica da réplica da esponja também conhecida como "*polymer sponge method*" consiste na impregnação de uma esponja polimérica ou natural com uma barbotina cerâmica. Após, segue-se o tratamento térmico do material, quando ocorrerá a queima

(decomposição) do material orgânico e sinterização inorgânica (processo no qual a temperatura de processamento é menor que a temperatura de fusão). As pequenas partículas do material se ligam por difusão no estado sólido, transformando o material compacto poroso em um produto resistente e denso. À medida que as partículas se tornam maiores com o tempo de sinterização, a porosidade diminui e com isso atinge-se um tamanho de grão de equilíbrio do material cerâmico, resultando em um corpo cerâmico que consiste na réplica da estrutura da esponja em que a barbotina foi impregnada inicialmente (STUDART *et al.*, 2006).

BAINO *et al.* (2013) relatam e comparam em seu trabalho um *scaffold* desenvolvido e estudado por Vitale-Brovarone e colaboradores. O *scaffold* foi obtido pela técnica de replicação da esponja. Foram adicionados 30% de vidro em pó obtido pela técnica da fusão, seguindo a composição do tradicional Bioglass[®], 64% de água destilada e 6% de poli (álcool) vinílico (PVA) em modelos porosos de poliuretano. As amostras foram secas em temperatura ambiente por 6 horas e tratadas termicamente para remover a fase orgânica e sinterizar a fase inorgânica, obtendo assim *scaffolds* macroporosos derivados do vidro. Os *scaffolds* foram tratados termicamente a 1000⁰C por 3 horas. Nos testes de bioatividade por imersão do *scaffold* durante 7 dias em SBF, houve a formação de uma camada contínua de apatita de aproximadamente 75µm sugerindo a bioatividade do *scaffold* produzido.

A técnica "foaming" ou da espuma de barbotinas cerâmicas consiste na incorporação de uma fase gasosa (foaming) dispersa em uma suspensão (barbotina) contendo o material cerâmico, água, ligante polimérico, surfactante, e agentes de geleificação. Essas suspensões podem ser produzidas mecanicamente, através da injeção de um vapor; um gás produzido em uma reação exotérmica ou pela vaporização de um solvente de baixo ponto de fusão dissolvido, como o freon. Existe um intervalo entre a formação da bolha e a estabilização final da espuma. Algumas bolhas podem contrair e desaparecer, enquanto outras podem aglutinar e formar grandes bolhas. Os filmes que envolvem as bolhas podem permanecer intactos até a estabilização, levando à formação de uma espuma. Esses também podem se romper produzindo espumas parciais. Quando bolhas excessivamente grandes estão presentes a ruptura do filme leva ao colapso da espuma.

A estabilização da estrutura das bolhas pelo ajuste do sistema deve ocorrer durante toda a vida útil da espuma (SANTOS, 2002; COELHO, 2003).

A técnica de inclusão de agente porogênico envolve a mistura do pó cerâmico ou barbotina cerâmica e agente porogênico. Em seguida, faz-se a compactação ou moldagem e posteriormente remove-se o agente porogênico no processo de pré sinterização da cerâmica, por queima ou volatilização, o que ocorre com facilidade quando utiliza-se agente porogênico orgânico fugitivo (IKEGAMI, 2007).

CROVACE (2009) testou e comparou cinco agentes porogênicos: (i) naftaleno, (ii) amido de milho, (iii) amido de mandioca, (iv) microesferas de polietileno e (v) negro de fumo. A técnica de adição de agentes porogênicos permitiu a obtenção de *scaffolds* exibindo porosidade total entre 67 e 87%, com estrutura de poros altamente interconectada. Os *scaffolds* foram sintetizado a partir do pó do VB com 45% de sílica, obtido pela técnica da fusão. O melhor resultado foi alcançado através do uso do negro de fumo, porque o tamanho médio de poros e porosidade total obtidos foram superiores aos outros agentes porogênicos, 230 μ m e 87%, tornando-o o mais promissor para aplicação como *scaffold*. A Figura 1.3 mostra a imagem do MEV dos *scaffolds* produzidos pela técnica de inclusão de diferentes agentes porogênicos.

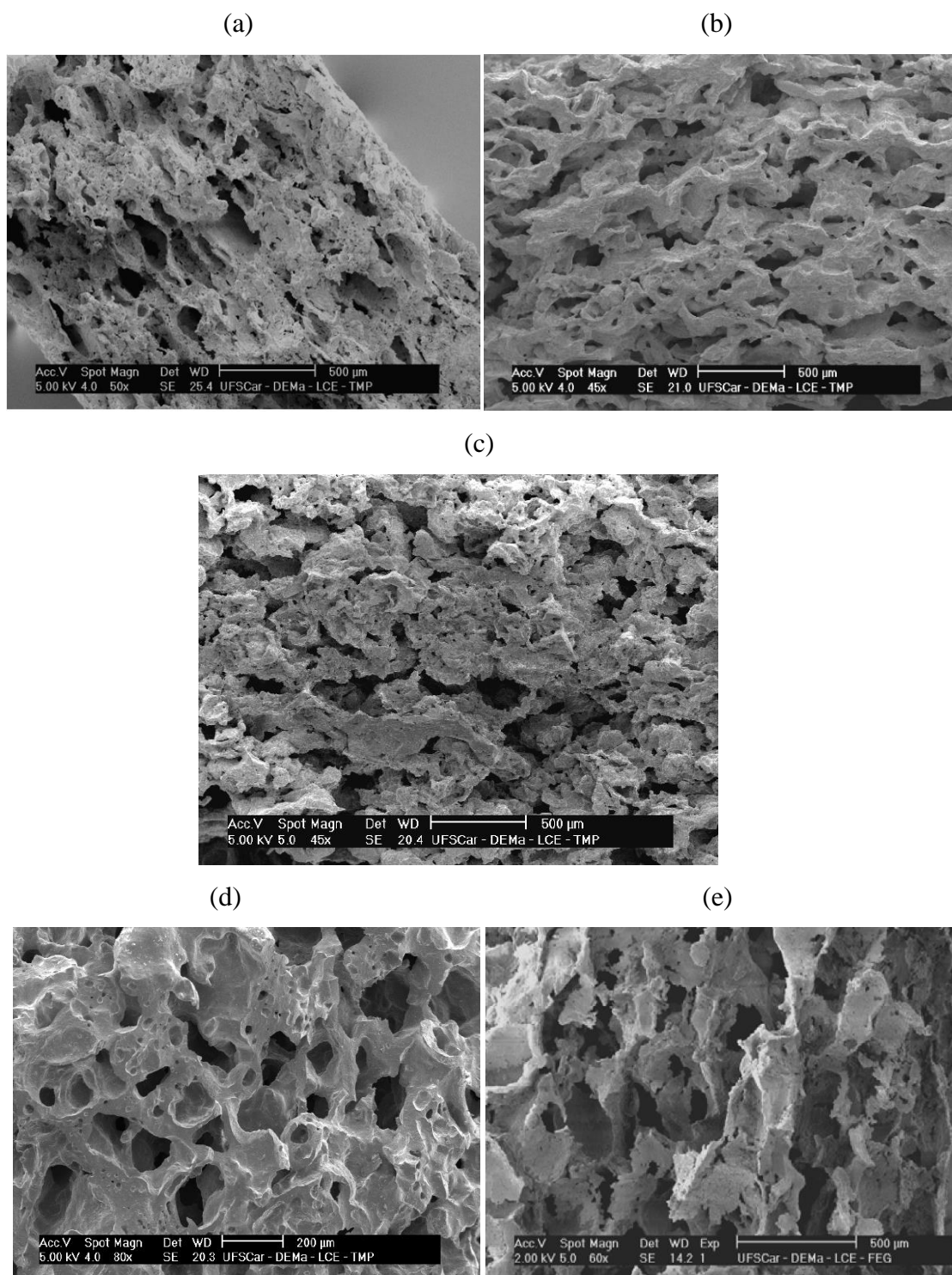


Figura 1.3- MEV dos *scaffolds* produzidos pela técnica de inclusão de agentes porogênicos: (a) naftaleno, (b) amido de milho, (c) amido de mandioca, (d) microesferas de polietileno e (e) negro de fumo (CROVACE, 2009).

A técnica conhecida como robocasting pode construir *scaffolds* por depósito de VB camada por camada. A vantagem desta técnica é que a estrutura de poros é ditada por desenho arquivado em computador, CAD (desenho auxiliado por computador). *Scaffolds* de VB foram produzidos por *robocasting*. Os *scaffolds* produzidos apresentaram resistência a compressão >150MPa em direção aos canais dos poros e de 50MPa perpendicular a direção dos canais dos poros em matrizes, com 60% de porosidade. A composição do VB usada foi 6P53B (51,9 mol.% SiO₂, 9,8 mol.% Na₂O, 1,8 mol.% K₂O, 15,0 mol.% MgO, 19,0 mol.% CaO, 2,5 mol.% P₂O₅) com tamanho de partícula de 1,2µm. Barbotinas foram preparadas com mistura de 30% de volume das partículas de VB em 20% de solução de pluronic F-127. As barbotinas foram extrudadas por uma abertura na seringa de 100µm e impressas em um substrato de alumina. Após os *scaffolds* serem imprimidos, eles foram secos e tratados a 700^oC. Os vidros obtidos pela rota sol-gel também podem ser utilizados para produzir *scaffolds* por *robocasting*. Pós de VB foram misturados com um ligante, como álcool polivinílico aquoso (PVA) e impressos. Obteve-se *scaffolds* com 60% de porosidade e tamanho de poro de 1mm, com força de compressão de 16MPa. Devido a natureza do processo sol-gel, o sol pode ser usado diretamente e impresso em um substrato antes da gelificação (JONES, 2013). A Figura 1.4 mostra um exemplo de *Scaffolds* de VB feitos por *robocasting* (JONES, 2014).

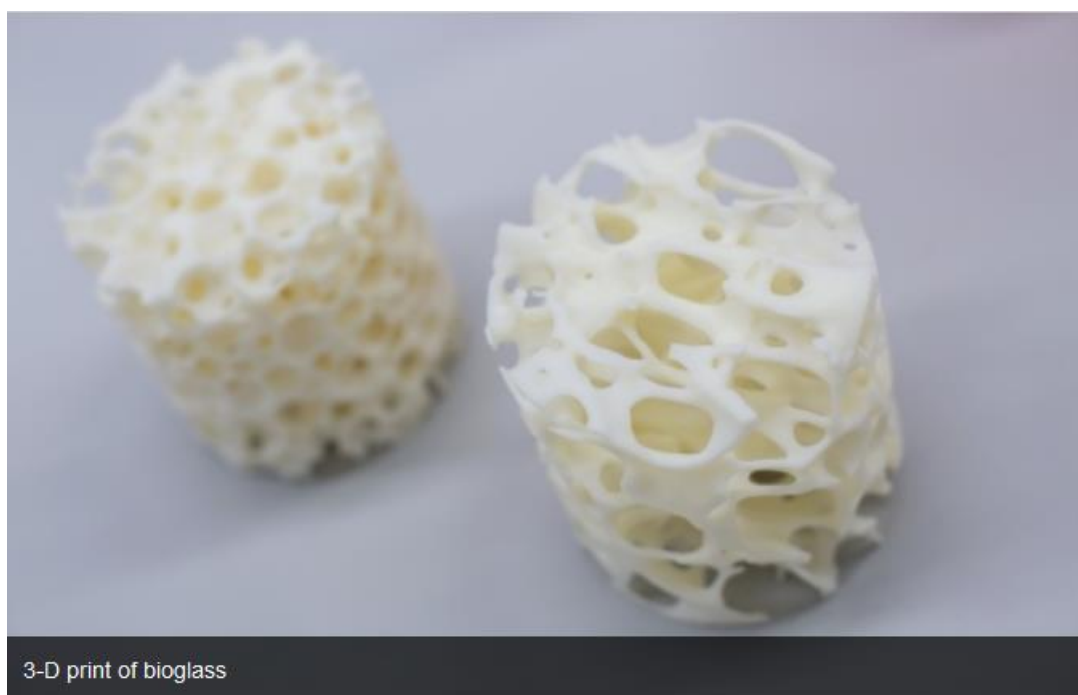


Figura 1.4- *Scaffolds* de VB feitos por *robocasting* (JONES, 2014).

O desenvolvimento de *scaffolds* de VB por *electrospun* é demonstrado por POOLOGASUNDARAMPILLAI *et al.* (2014) que desenvolveram *scaffold* de VB 70S30C por *electrospun* com fibras de pequeno diâmetro, em média 0,5-2 μ m, com arquitetura de macroporos em 3-D. O processo sol-gel foi usado em combinação com *electrospinning* para produzir *scaffold* 3D para regeneração óssea. A estrutura de fibras 3-D é ideal para preenchimento de defeitos complexos. O espaço maior entre as fibras promove vascularização, penetração de células e transporte de nutrientes através do *scaffold*. Este estudo apresentou novas condições de processamento para produzir uma solução sol-gel inorgânica viscoelástica que resultou em emaranhado de fibras com ligações intermoleculares com partículas de nanosílica na solução, eliminando a necessidade de ligante, somente quando soluções contendo nitrato de cálcio foram usadas, sugerindo que a concentração de íons Ca^{2+} tem um efeito significativo. O biomaterial mostrou bioatividade quando imerso em SBF e não apresentou citotoxicidade quando em contato em cultura de células pré osteoblásticas MC3T3-E1, sendo observados crescimento e ligação celular ao material. A Figura 1.5 mostra imagens de

MEV das fibras de VB obtidas pela rota sol-gel e *electrospun*. A Figura 1.6 mostra o biomaterial 70S30C e uma de suas possíveis aplicações.

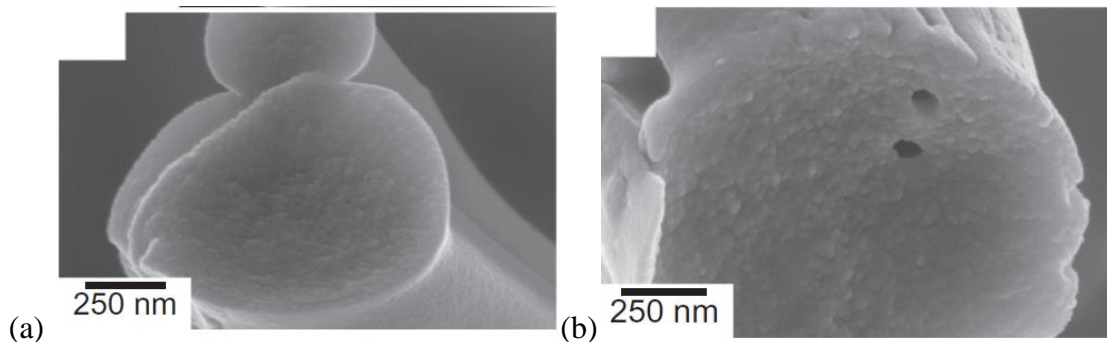


Figura 1.5- MEV das fibras de VB obtidas pela rota sol-gel e *electrospun*, (a) 100S e (b) 70S30C. A imagem mostra a superfície lisa das fibras 100S e a estrutura de nanoporos da fibra 70S30C (POOLOGASUNDARAMPILLAI *et al.*, 2014).

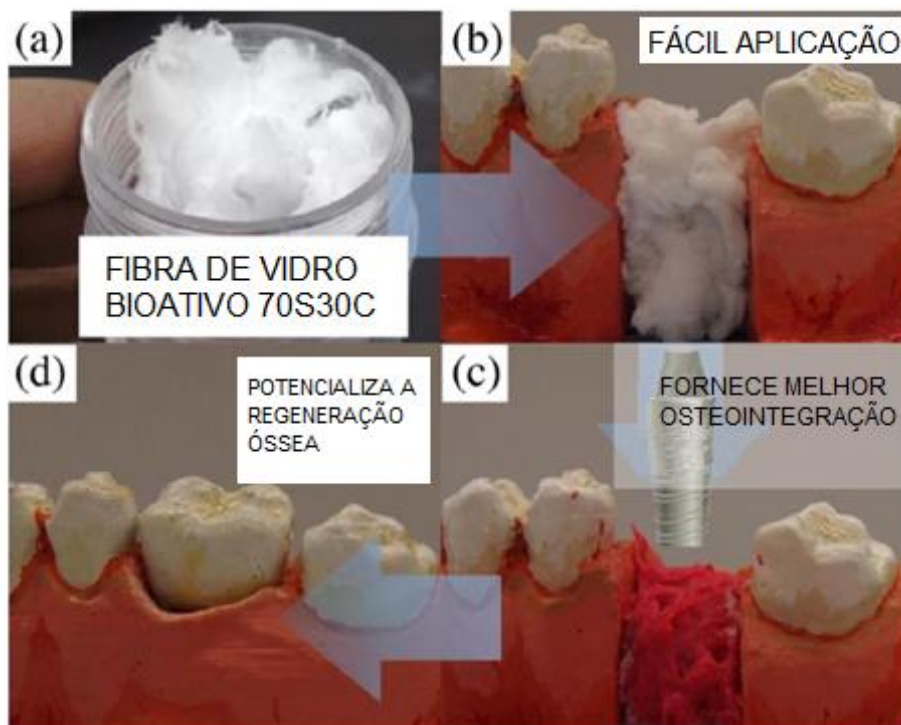


Figura 1.6- (a) biomaterial 70S30C, (b) biomaterial inserido no local do dente extraído, (c) colocação do implante, (d) colocação da coroa dental (POOLOGASUNDARAMPILLAI *et al.*, 2014).

1.3.3 VIDRO BIOATIVO

O estudo dos materiais bioativos iniciou-se pelos tecidos do sistema ósseo dentário, já que uma exposição maior a esforços físicos torna mais dramática a necessidade de uma interação forte entre tecido-biomaterial. O conceito de cerâmica bioativa capaz de ligar-se ao tecido ósseo foi originalmente sugerido por Larry Hench e colaboradores no início da década de 1970. O mecanismo de formação de ligação envolve uma série de reações físico-químicas complexas, em que a formação de uma camada de fosfato de cálcio biologicamente ativa é induzida pelo material do implante. Uma característica das cerâmicas bioativas é a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) na superfície do implante. Esta fase é equivalente em composição e estrutura à fase mineral do osso e é responsável pela ligação interfacial (PEREIRA *et al.*, 2012).

Os VBs constituem os mais efetivos materiais bioativos já pesquisados, ou seja, aqueles que formam ligações mais pronunciadas com os tecidos vivos. A bioatividade dos vidros foi observada para certas composições contendo CaO, P₂O₅ e Na₂O e outras composições como o boro que também são bioativas, além da sílica, em implantes introduzidos em ossos. Tal composição visa à formação de superfície apta a promover ligação tecido-material (osso-material), além de proteger o material da total dissolução. No nível do arranjo atômico, o que distingue os materiais vítreos dos materiais cristalinos é a ausência de periodicidade. Os vidros são normalmente formados pelo resfriamento de uma mistura de matérias primas no estado líquido em alta temperatura. A taxa de resfriamento é extremamente importante para estes materiais, taxas excessivamente lentas permitem o rearranjo dos átomos que se encontram dispersos na fase líquida, provocando a cristalização do material. Vidros também podem ser formados utilizando-se formadores (normalmente a sílica, SiO₂) e modificadores da rede, normalmente íons alcalinos (Na, K). Tais componentes permitem a formação de materiais vítreos em que a estrutura de rede tridimensional não organizada é formada pela sílica, com os íons alcalinos ocupando sítios aleatórios na estrutura da sílica, o que ocasiona a formação de uma estrutura que não apresenta periodicidade. Outros íons podem ainda ser adicionados a essa estrutura aleatória, permitindo a modificação de suas propriedades (PEREIRA *et al.*, 2012).

Os vidros são materiais de caráter amorfo, ou seja, não apresentam cristalinidade. São formados por um elemento de elevado estado de oxidação, normalmente o silício, responsável por formar uma rede tridimensional infinita, sendo então, um formador de rede. A inclusão de cátions (modificadores de rede) na estrutura aberta dos vidros amorfos permite produção de uma larga escala de vidros de sílica. A presença de cátions tais como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} no vidro causa a descontinuidade da rede através do rompimento de ligações Si-O-Si . O rompimento destas ligações pelos cátions permite a solidificação do fundido com alto grau de desordem, no VB produzido por fusão. A estrutura dos vidro de silicato é formada por tetraedros (SiO_4). Esta estrutura desordenada, realçada pela presença de modificadores de rede, causa aumento da reatividade destes vidros em meio aquoso. A reatividade é a principal vantagem de aplicações dos VBs em reparos ósseos, visto que o produto obtido pela reação deste tipo de vidro com fluido fisiológico resulta na formação de hidroxiapatita cristalina (CORBELLINI, 2006).

A Figura 1.7 mostra as etapas de reações interfaciais entre o osso e o VB classe A (HENCH, 2014).

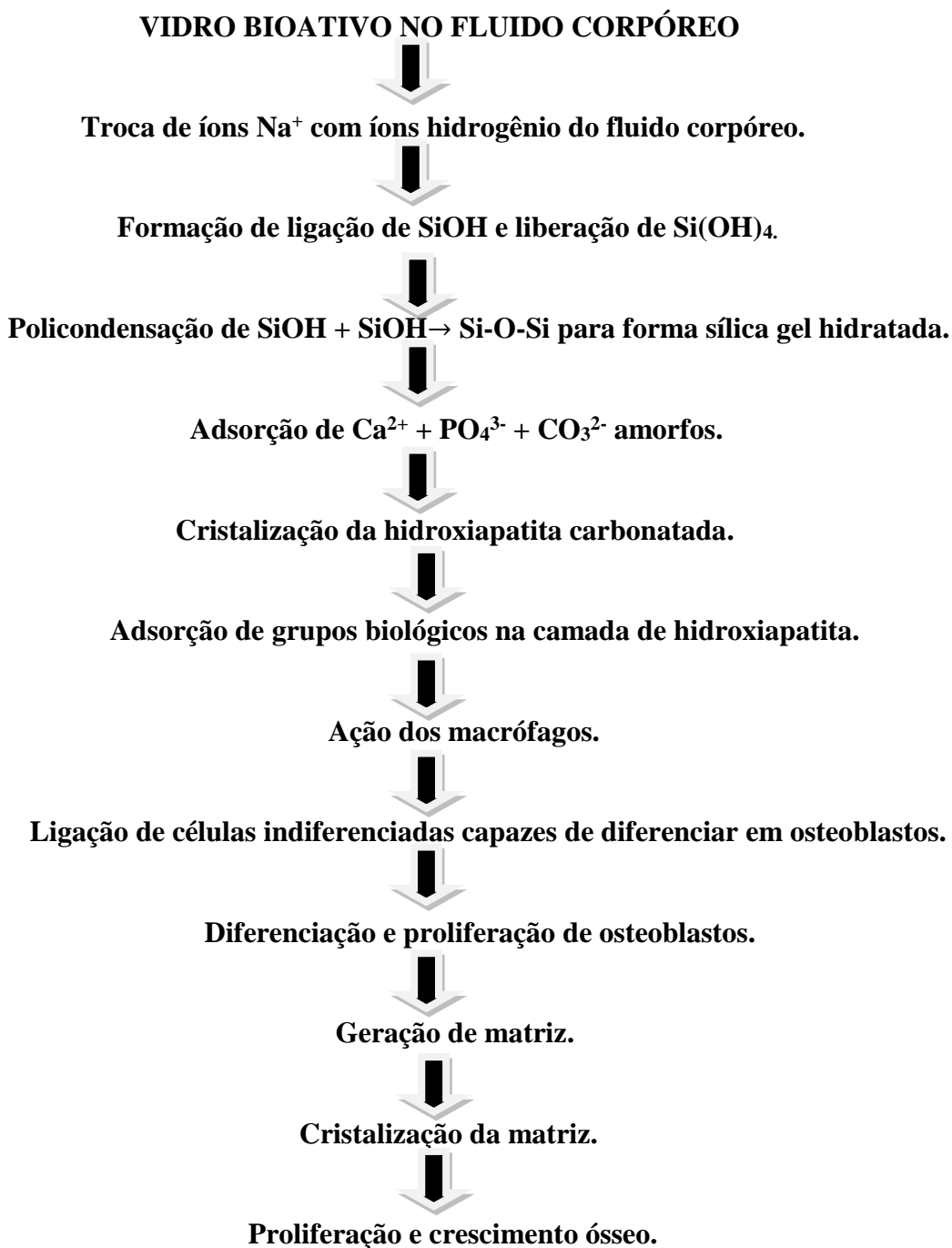


Figura 1.7- Fluxograma mostrando as etapas de reações interfaciais entre o osso e o VB classe A (HENCH, 2014).

A capacidade do biomaterial ligar-se ao osso é importante, mas não é suficiente para que o biomaterial seja usado como dispositivo biomédico. A taxa de degradação deve ser ajustada ao tempo de remodelação óssea. Em determinados tratamentos, espera-se

que o VB não reabsorva tão rapidamente, como nos defeitos ósseos críticos, considerando idade e saúde do paciente, tamanho e localização anatômica da lesão (BELLUCCI *et al.*, 2010).

MA *et al.* (2010) avaliaram a influência da temperatura de sinterização nas características estruturais e bioatividade do VB. Os pós foram submetidos a tratamento térmico a 700⁰, 900⁰, 1000⁰ e 1200⁰C. As amostras foram imersas em um fluido corpóreo simulado (SBF). A formação de camada de apatita na superfície das amostras foi determinada por DRX, MEV, e FTIR. As amostras, depois de 7 dias imersas em SBF, apresentaram picos característicos de apatita (JCPDS 24-0033). As amostras tratadas a 700⁰C mostraram dois grandes picos de difração correspondentes aos planos (0 0 2) e (2 1 1), característicos de uma fase apatita. Em altas temperaturas (900-1200⁰C), ocorreu cristalização e vitrocerâmicas foram formadas. Entretanto, a cristalização não inibiu completamente a bioatividade das amostras. Após os 7 dias de imersão das amostras em SBF foram observadas nos espectros FTIR bandas de absorção de fosfato em 1043, 603, 568 e 469cm⁻¹ em todas elas. Os picos 603 e 568cm⁻¹ são característicos do fosfato na fase cristalina. Bandas de absorção de carbonato de 1490, 1423 e 874cm⁻¹ foram também detectadas. Isso confirmou a formação de uma camada semelhante a apatita e também determinou a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada, sendo menores para as amostras tratadas a 900⁰, 1000⁰ e 1200⁰C. Na análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), após 7 dias de imersão em SBF a formação de apatita foi maior nas amostras tratadas em 700⁰, 900⁰ e 1000⁰C. As amostras tratadas a 700⁰C foram completamente cobertas por camada de apatita. Para as tratadas a 900⁰C uma nova camada de apatita foi formada. Entretanto, para amostras tratadas a 1000⁰C, as superfícies não foram completamente cobertas e aglomerados foram observados em algumas áreas. Nas amostras tratadas a 1200⁰C houve cobertura parcial, com poucas e pequenas partículas esféricas. Os autores concluíram que a cristalização do VB 58S ocorreu à temperatura de 890 - 929⁰C e que a cristalização diminuiu a bioatividade do VB.

1.3.4 PROCESSAMENTO VIA SOL GEL

Os vidros bioativos obtidos pelo método convencional de fusão que apresentam índice de bioatividade ($IB > 8$) não devem exceder a concentração de SiO_2 em 55% em mol na rede do vidro, pois as taxas de reação caem muito e a formação de ligação com osso é muito lenta. O método sol-gel foi desenvolvido em uma tentativa de se elevar a reatividade de VBs, já que este método fornece materiais com elevada área superficial, além de poder ser realizado em temperaturas bem mais baixas. Os vidros produzidos pelo processo sol-gel apresentaram bioatividade até para materiais contendo 100% de SiO_2 (PEREIRA *et al.*, 2012).

Devido às suas excelentes propriedades, ainda hoje se utiliza e estuda o primeiro VB produzido, 45S5. Porém, este é proveniente do processo de fusão, no qual são utilizadas temperaturas extremamente elevadas, além de processos posteriores para obtenção do material final (PEREIRA, 2013). Os vidros obtidos por fusão ou método convencional possuem um limite de 60% de SiO_2 para o qual se observa bioatividade. Uma possível explicação para o limite da composição para bioatividade é a presença de poros muito pequenos, grande área superficial específica e alta concentração de grupos silanol (SiOH) sobre a superfície do material, alterações dessas características são conseguidas com o processo sol-gel. Esses aspectos estruturais são responsáveis pelo aumento da densidade de sítios potenciais para nucleação que resulta na formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada sobre o VB. As estruturas mesoporosas de materiais bioativos obtidos pelo método sol-gel, com poros na faixa de 2-50nm, são bem mais favoráveis do que aquelas completamente densas, porque estes materiais possuem alta área superficial o que resulta em alta bioatividade e elevada tendência à biorreabsorção (COELHO, 2003).

O processo sol-gel é conhecido há muito tempo, porém estes materiais só ganharam importância nas últimas décadas. Em 1846, Ebelmen obteve o primeiro composto derivado da técnica sol-gel, o tetraetóxido de silício. Ele relatou o preparo deste composto a partir do SiCl_4 e álcool após o processo de gelificação ou geleificação, obtendo assim um sólido transparente. Os materiais sol-gel foram reconhecidos em

escala industrial somente no final da década de 1930, quando Geffcken e Bergen, da companhia Schott Glass desenvolveram um processo de produção de filmes de óxidos metálicos com propriedades ópticas para recobrimento de vidros. Surgiram assim os primeiros estudos sobre deposição de filmes por imersão, ou dip-coating, em 1939. No final da década de 1960 e início de 1970, a indústria cerâmica começou a se interessar pela química sol-gel. Com o processo sol-gel existe a possibilidade do controle das taxas de hidrólise e condensação de alcóxidos durante a transição sol-gel para o preparo de vidros multicomponentes. No entanto, somente após demonstrarem que compostos sólidos podiam ser produzidos pela secagem desses géis, é que se verificou uma grande expansão na aplicação deste processo em várias áreas da tecnologia, como no desenvolvimento de condutores, adsorventes cromatográficos, sensores e biossensores, cerâmicas magnéticas, filmes supercondutores, revestimentos ópticos e catalisadores. Nas últimas décadas, houve um crescimento significativo no interesse pelo processo sol-gel devido ao fato de que os materiais obtidos por este método apresentarem alta pureza, homogeneidade e temperatura de processamentos muito inferiores, quando comparados àqueles formados pelos métodos tradicionais de obtenção de revestimentos (SCARAMAL, 2010).

O processo sol-gel consiste basicamente na transformação de um sol, suspensão coloidal de partículas sólidas em um líquido, em um gel. A diferença entre um sol e uma solução é que a solução é um sistema de uma fase única, enquanto que um sol é uma suspensão de uma fase sólida em uma fase líquida. Em um sol, as partículas coloidais são tão pequenas, da ordem de 1 a 100nm, que as forças gravitacionais são desprezíveis e as interações são dominadas por forças de pequena ordem, tais como atração de Van der Waals e cargas superficiais. A formação de um gel coloidal ou particulado é resultado da diminuição da carga superficial das partículas suspensas, que perdem a sua mobilidade através da sua interconexão, dando origem a uma rede tridimensional rígida e porosa, conhecida como gel. Os géis podem ser obtidos também pelo controle da polimerização de um composto precursor hidrolisado, resultando em uma rede inorgânica, uma única molécula que alcança dimensões macroscópicas de forma a se estender através da solução. Um gel úmido então é uma substância que contém um esqueleto sólido contínuo cercado de uma fase líquida. No processo sol-gel,

os precursores usados para a preparação do colóide consistem de um elemento metálico rodeado por vários ligantes não-metálicos. Os precursores podem ser inorgânicos ou orgânicos, os mais usados são os alcóxidos metálicos (OLIVEIRA, 2007). A Figura 1.8 mostra o esquema das reações no processo sol-gel com formação de nanopartículas e sílica tetraédrica à temperatura ambiente.

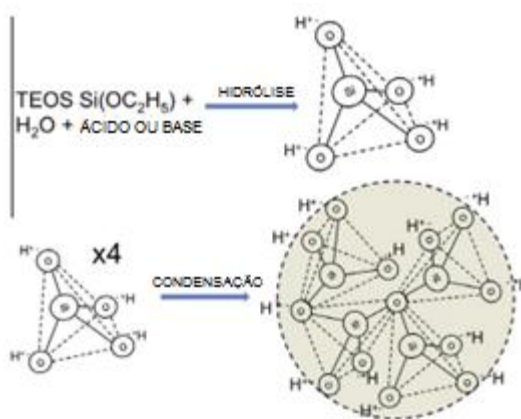
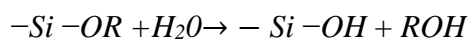


Figura 1.8- Esquema mostrando as reações no processo sol-gel: formação de nanopartículas e sílica tetraédrica à temperatura ambiente (JONES, 2013).

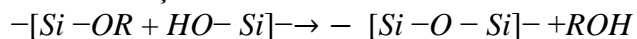
Os géis silicatos poliméricos são produzidos pelas reações de hidrólise e condensação do precursor alcóxido. Considerando os grupos funcionais, três reações (Equações 1, 2 e 3) são geralmente usadas para descrever o processo sol-gel:

• Hidrólise:



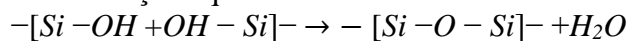
Equação 1: reação de hidrólise.

• Condensação alcoólica:



Equação 2: reação de condensação alcoólica.

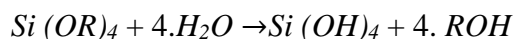
Condensação aquosa:



Equação 3: reação de condensação aquosa.

A reação de hidrólise (Equação 1) substitui um grupo alcóxido (OR) por um grupo hidroxila (OH). Dependendo da quantidade de água presente, a hidrólise pode se

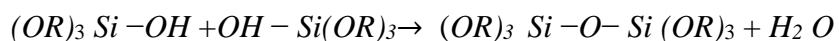
processar até o final, de forma que todos os grupos OR são substituídos por OH (Equação 4), ou parar enquanto o precursor está parcialmente hidrolisado (Equação 5). Duas moléculas hidrolisadas parcialmente podem se ligar em uma reação de condensação envolvendo grupos silanol ($Si-OH$) para produzir ligações siloxanas ($Si-O-Si$) mais água ou álcool como subproduto (Equações 6 e 7).



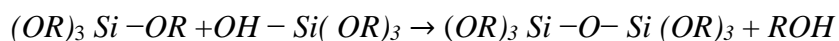
Equação 4: reação de hidrólise completa.



Equação 5: reação de hidrólise incompleta.



Equação 6: reação de condensação com água como subproduto.



Equação 7: reação de condensação com álcool como subproduto.

Tais reações podem continuar pelo processo de condensação do alcóxido, resultando em uma estrutura ramificada (Figura 1.9) porque o monômero $Si(OR)_4$ é tetrafuncional. Por outro lado, sob certas condições, como baixa concentração de água, as reações de hidrólise incompletas podem capacitar a condensação, resultando em cadeias com braços relativamente pequenos (OLIVEIRA, 2007).

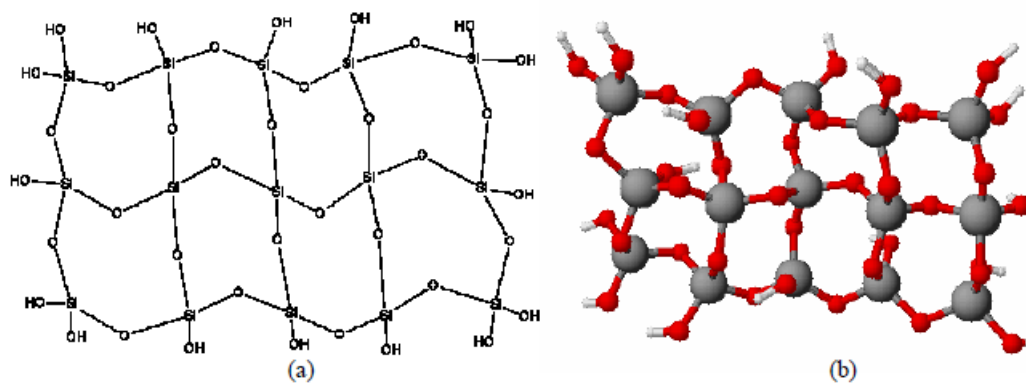


Figura 1.9- Rede tridimensional formada pela reação de hidrólise do precursor TEOS, estruturas (a) planar e (b) tridimensional (OLIVEIRA, 2007).

Os parâmetros de reação que influenciam a química do processo sol-gel são o pH da solução, a razão entre os moles de sílica e água, os catalisadores, os solventes e a temperatura de reação. A cinética da reação e a estrutura final do gel são fortemente influenciadas pelo caráter ácido ou básico do catalisador. Sendo a hidrólise catalisada por uma base, a reação ocorre através de substituição nucleofílica, e a velocidade de hidrólise é maior que a velocidade de condensação, formando cadeias mais ramificadas no início do processo. Se a hidrólise for catalisada por um ácido, ocorre reação eletrofílica, e a velocidade da condensação será maior que a da hidrólise, levando à formação de cadeias mais longas e menos ramificadas no início do processo (BARRIONE, 2014).

O processo de polimerização pode ser dividido em três domínios de pH's: pH abaixo de 2, entre 2 e 7 e acima de 7. Esses domínios são estabelecidos de acordo com as características superficiais da sílica: o ponto de carga zero (PCZ), em que a carga superficial é zero, e o ponto isoelétrico (PIE), onde a mobilidade das partículas da sílica é zero, ambos na faixa de pH entre 1 e 3. O limite de pH igual a 7 aparece quando tanto a solubilidade como a taxa de dissolução são maximizadas e porque as partículas de sílica são ionizáveis apreciavelmente acima desse valor de pH, de forma que o crescimento das partículas ocorre sem agregação ou gelificação. O valor de pH=2 representa a região de metaestabilidade, onde os tempos de gelificação são bastante

longos. A formação e a agregação de partículas primárias ocorrem simultaneamente. As partículas carregam pouca carga, o que permite a colisão entre elas, dando origem a cadeias e, posteriormente, a um sólido tridimensional. Em pH's entre 2 e 7, a polimerização ocorre entre espécies condensadas. Uma vez formados os dímeros, eles reagem preferencialmente com monômeros para formar trímeros e, tornam a reagir para formar tetrâmeros. O crescimento e agregação ocorrem por contínua adição de moléculas pequenas, às moléculas mais condensadas, formando cadeias e, por fim, uma rede tridimensional. Perto do PIE, os processos de crescimento e agregação ocorrem juntos e são indistinguíveis. A solubilidade é baixa nessa faixa de pH, e quando as partículas alcançam tamanhos entre 2 a 4nm, o crescimento das partículas param, já que a solubilidade é fortemente reduzida. Acima do pH igual a 7, as partículas de sílica são carregadas negativamente e repelem-se mutuamente. Com isso, elas não colidem, proporcionando um crescimento das partículas sem agregação. A solubilidade dessas partículas influencia na taxa de crescimento, já que depende da distribuição de tamanho. Como as partículas pequenas são mais solúveis do que as grandes, têm-se uma tendência geral de crescimento do tamanho médio das partículas e uma diminuição no seu número total (BARRIONI, 2014).

O processo sol- gel é realizado em algumas etapas:

- 1) mistura: o sol é formado através da mistura mecânica das partículas coloidais em água; as reações envolvendo o tetraetilortosilicato (TEOS - fornecedor de silício para a formação do vidro) liberam água e álcool que resultam no início da formação das redes de sílica, as quais mantêm presos em seu interior água e álcool expelidos pela reação do TEOS. Estas reações são chamadas de hidrólise e policondensação e podem ocorrer em variadas temperaturas;
- 2) moldagem: devido sua baixa viscosidade, o sol deve ser colocado em moldes;
- 3) geleificação: as partículas coloidais e a sílica condensada se conectam formando uma rede tridimensional, aumentando consideravelmente a viscosidade e formando um sólido no formato do molde;
- 4) envelhecimento: o material do molde permanece imerso em líquido por um período de tempo que pode variar de horas a alguns dias, durante este período continuam a ocorrer as reações de policondensação concomitantemente com a solução e precipitação

de redes do gel, fator que aumenta a espessura dos pescoços formados entre as partículas e diminui a porosidade;

5) secagem: durante a secagem ocorre a remoção do líquido presente nos poros interconectantes da rede; logo este processo deve ser controlado de forma a evitar trincas e falhas no material durante a evaporação da água;

6) desidratação ou estabilização química: após esta etapa o sólido se torna ultraporoso e estável quimicamente uma vez que as ligações de silanol são removidas da rede dos poros;

7) densificação: os poros são eliminados por meio da exposição do material a altas temperaturas.

1.3.5 AGENTES POROGÊNICOS

Para o sucesso de um *scaffold* devem ser considerados suas características anatômicas, como tamanho e forma dos poros, morfologia da parede dos poros, porosidade, área de superfície e interconectividade dos poros, esses são provavelmente os parâmetros críticos que terão impacto no cultivo celular, diferenciação e migração celular, transporte de oxigênio, nutrientes e metabólicos celulares que conduzirão a formação tecidual em três dimensões (MELCHELS *et al.*, 2009; HELMINEN *et al.*, 2002; RONCA, 2010).

O *scaffold* deve ter resistência mecânica necessária para sua retenção após implantado, particularmente na reconstrução de tecido ósseo. Essa bioestabilidade depende de fatores como: força aplicada, estabilidade do material, absorção na interface do material e degradação química. A reprodutibilidade do processo de fabricação do *scaffold* é de extrema importância devido sua forma final ter uma influência crítica na sua função (YANG, 2001; IKEGAMI, 2007).

A estrutura de poros interconectados facilita a engenharia de tecido ósseo por permitir a introdução de células mesenquimais, agentes osteogênicos tais como proteínas morfogenéticas ósseas ou vasculares dentro dos poros. (YOSHIKAWA *et al.*, 2009).

O crescimento tecidual é relacionado com o tamanho dos poros do *scaffold*. Com poros menores que 10 μ m não há crescimento tecidual, entre 10 e 50 μ m há crescimento fibrovascular, entre 50 e 150 μ m há formação de osteóide e acima de 150 μ m há crescimento ósseo. O nível de porosidade deve ser superior a 50% de volume no biomaterial. A porosidade busca aumentar a reabsorção do biomaterial e a extensão da bioatividade, por aumentar a área de superfície disponível para reação tecidual. Entretanto, o desenvolvimento de materiais com alta porosidade total não assegura a penetração de proteína e a proliferação celular, a menos que haja uma adequada distribuição dos poros (LUIZ, 2013).

KANG *et al.* (2011) desenvolveram um *scaffold* de β -TCP com poros interconectados pelo método de fundição de molde. O método incluiu o preparo de pequenos grânulos de parafina e a lama cerâmica de β -TCP, fundiu-se a lama dentro do molde com grânulos de parafina que foi solidificado e sinterizado. As esferas de parafina usadas no estudo foram de tamanho entre 0,71 e 1mm. O pó de β -TCP, pó de CMC, dispersante (Darvan C) e surfactante (Surfonals) foram misturados com água destilada e agitados para formar uma pasta cerâmica. As esferas de parafina preencheram os moldes personalizados e a suspensão de β -TCP foi introduzida nos moldes, sob vácuo. Após a remoção do corpo verde desidratado do molde, esse foi tratado a 1250 $^{\circ}$ C por 3 horas. A porosidade dos *scaffolds* foram $82,49 \pm 0,04\%$ e o tamanho dos poros 350–500 μ m, a força de compressão do *scaffolds* foi $3,41 \pm 0,3$ MPa.

MACHADO *et al* (2009) confeccionaram *scaffolds* teciduais baseados em cimento de α -fosfato tricálcico e microesferas de parafina como agente porogênico, (Figura 1.10) homogeneizando-se manualmente as esferas de parafina juntamente com o cimento de α -TCP e adicionando a fase líquida. A análise termogravimétrica da parafina mostrou o pico de degradação a aproximadamente 370 $^{\circ}$ C, mas a degradação completa ocorreu pouco antes de 600 $^{\circ}$ C. A temperatura de fusão da parafina é em torno de 70 $^{\circ}$ C. Os *scaffolds* obtidos com esferas de parafina tiveram poros com formato esférico e interconectados. A resistência dos *scaffolds* foi mínima suficiente para o manuseio dos mesmos, o que de certo modo já é suficiente, pois os arcabouços deverão ganhar resistência mecânica com a proliferação de osteoblastos ao formar o tecido ósseo.

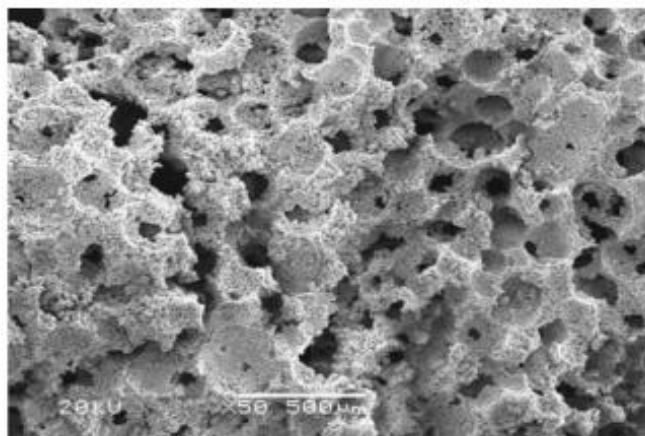


Figura 1.10- Imagem de MEV do arcabouço confeccionado com 82% de parafina (MACHADO *et al.*, 2009).

O plano de trabalho, a discussão e os resultados são apresentados nos capítulos a seguir. A metodologia, a discussão e resultados foram divididos em dois capítulos (3 e 4). O capítulo 3 envolve o desenvolvimento da técnica de obtenção de *scaffolds* por adição de agente porogênico e a seleção do melhor agente em função das características estruturais obtidas. O capítulo 4 propõe a obtenção de *scaffolds* de VB com variação da composição (58S e 100S) e da temperatura de sinterização (700, 800 e 900⁰C), usando o agente porogênico escolhido. O capítulo 5 são as considerações finais.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho é propor nova rota de obtenção de *scaffolds* porosos de VB, através da adição de agentes porogênicos, avaliar os efeitos que a mudança na composição química e temperatura de tratamento podem provocar na cristalinidade dos materiais obtidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS POR CAPÍTULO:

Capítulo 3:

-Desenvolver nova rota de obtenção de *scaffolds* porosos de VB, através da incorporação de agentes porogênicos em solução precursora obtida pelo método sol-gel.

-Avaliar o efeito da adição de diferentes agentes porogênicos ao *scaffold* e determinar qual agente porogênico mais apropriado na produção dos *scaffolds*, através da caracterização das amostras por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microtomografia computadorizada (μ CT).

Capítulo 4:

-Preparar *scaffolds* de VB 58S (SiO_2 60%-36%CaO-4% P_2O_5 em mol ou 58% SiO_2 -33%CaO-9% P_2O_5 em massa) e VB 100S (SiO_2 100% composição molar) pela nova rota, utilizando o agente porogênico com características mais favoráveis definidas no capítulo 3 .

-Tratar termicamente os *scaffolds* de VB a 700, 800 e 900⁰C.

-Caracterizar e comparar as amostras por meio de difração de raio-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microtomografia computadorizada (μ CT) e análises de adsorção de N_2 (BET).

-Avaliar a citotoxicidade do biomaterial.

CAPÍTULO 3

3 SELEÇÃO DO AGENTE POROGÊNICO

A técnica de adição de agentes porogênicos é uma técnica versátil, uma vez que uma infinidade de agentes porogênicos podem ser utilizados. Além disso, não encontramos na literatura nenhum estudo sobre adição de agentes porogênicos ao VB obtido via sol-gel.

Serão testados os seguintes agentes porogênicos, com características físicas diferentes: parafina em duas diferentes conformações, cera e carboximetilcelulose (CMC).

As parafinas são hidrocarbonetos saturados, nos quais os átomos de carbono e hidrogênio estão ligados entre si somente por ligações simples, formando cadeias lineares, ramificadas, cíclicas, interligadas ou não (AUM, 2012).

Os componentes da cera utilizada são: *colophonium* (resina natural), rosinato de glicerina, *Ricinus communis* (óleo de semente de mamona), parafina, cera microcristalina e cera de veículos.

A Carboximetilcelulose (CMC) é obtida através da reação da celulose com monocloroacetato de sódio. O CMC é um hidrocolóide que contribui para formação de gel, na retenção de água, além de apresentar propriedades de polieletrólito. As presenças de substituintes com grupos $-CH_2-COOH$, na cadeia da celulose produz um afastamento das cadeias poliméricas e permitem maior penetração de água, conferindo ao CMC solubilidade em água. A estrutura da CMC é baseada no polímero β -(1,4)-D-glucopiranosose da celulose (ROHR, 2007).

O objetivo deste capítulo foi alterar a rota de obtenção de *scaffolds* porosos de VB, através da inclusão de agentes porogênicos.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 SÍNTESE DOS *SCAFFOLDS* COM 100% SiO_2 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES AGENTES POROGÊNICOS.

Os *scaffolds* de VB foram confeccionados, pela rota sol-gel, à princípio com composição 100% de sílica (VB100S). Os reagentes foram: alcóxido tetraetil ortosilicato (TEOS) - *Aldrich*, 98% de pureza, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, precursor de SiO_2 , água deionizada, ácido nítrico 2N – *Synth* e solução 5% v/v ácido fluorídrico HF - *Merck*.

A síntese seguiu o método sol-gel, rota alcóxido, com a seguinte metodologia para o vidro 100S: 220,4ml de água deionizada, 36,7ml de solução 2N de ácido nítrico (HNO_3) e 228,6ml de tetraetilortosilicato (TEOS) foram adicionados em um béquer e a agitação foi mantida por 60 minutos. O sol resultante foi misturado com o agente porogênico conforme a Tabela 3.1 juntamente com o HF, sendo este 5% (v/v) do sol. O produto resultante foi colocado em recipientes de teflon fechados hermeticamente com tampa lisa e porcas de teflon (Figura 3.1). A quantidade de agente porogênico adicionado, foi determinada pela máxima porcentagem dispersa do agente porogênico no VB sol-gel. Esses foram colocados na estufa para gelificação e envelhecimento a 60°C por 72 horas. Em seguida iniciou-se a secagem. As tampas foram trocadas por tampas com furos e fechadas com as porcas de teflon. Os recipientes foram colocados na estufa a 60°C e a temperatura foi elevada em 10°C a cada 24 horas até atingir a temperatura de 120°C e mantida por mais 24 horas. Os *scaffolds* foram tratados termicamente nas temperaturas 700, 800 e 900°C com taxa de aquecimento de 1°C por minuto, por 1440 minutos, para que degradasse toda a fase orgânica.

Tabela 3.1- Amostras para seleção dos agentes porogênicos

AMOSTRA	% DE SOL EM VOLUME	% DE AGENTE POROGÊNICO EM VOLUME	% DE HF (V/V DO SOL)
1 (Parafina-1)	45%	55%	5%
2 (Parafina-2)	30%	70%	5%
3 (Cera)	40%	60%	5%
4 (Parafina-1+ CMC)	27,4%	50,3% de parafina-1 22,3% de CMC	5%

A Figura 3.1 mostra os recipientes de teflon projetados para tornar mais eficiente a vazão do sol e confecção dos *scaffolds*. Observar que após a geleificação e envelhecimento a tampa lisa é trocada por tampa com furos, ambas de teflon, para iniciar a secagem.

Figura 3.1- Recipientes de teflon para confecção dos *scaffolds*.

3.1.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS *SCAFFOLDS*.

Foram realizadas análises MEV dos agentes porogênicos e dos *scaffolds* utilizando o equipamento FEI-INSPECT S50, operando a 20kV equipado com um espectrômetro de energia dispersiva (EDS) da EDAX Genesis.

A Microtomografia Computadorizada de raios-X (μ CT) dos *scaffolds* foi realizada por aparelho Skyscan 1174 (Aartselaar, Bélgica), equipado com câmera de 1,3mega pixel, utilizando-se fonte de 50kV e corrente de 800 μ A com resolução de 14 μ m. Foi utilizado filtro de alumínio com 1mm de espessura. As amostras foram fixadas em um suporte, e rotacionadas 180⁰, com imagens adquiridas a cada 0,7⁰. Após o escaneamento, cortes transversais foram reconstruídos em estruturas tridimensionais utilizando-se software SkyScan para análise.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 *SCAFFOLDS* OBTIDOS COM DIFERENTES AGENTES POROGÊNICOS.

Os agentes porogênicos foram analisados por MEV para avaliação de seus tamanhos e formatos. A cera (Figura 3.2) apresentou formato disforme e variação de tamanho de 9 a 204 μ m. O CMC mostrou forma alongada, com distribuição de tamanho de 28 a 382 μ m (Figura 3.3). A parafina 1, (Figura 3.4) apresentou formato mais arredondado com distribuição de tamanho de 609 a 993 μ m. A parafina 2 (Figura 3.5) mostrou formato arredondado e mais uniforme, com distribuição de tamanho de 1,9 a 2,3mm.

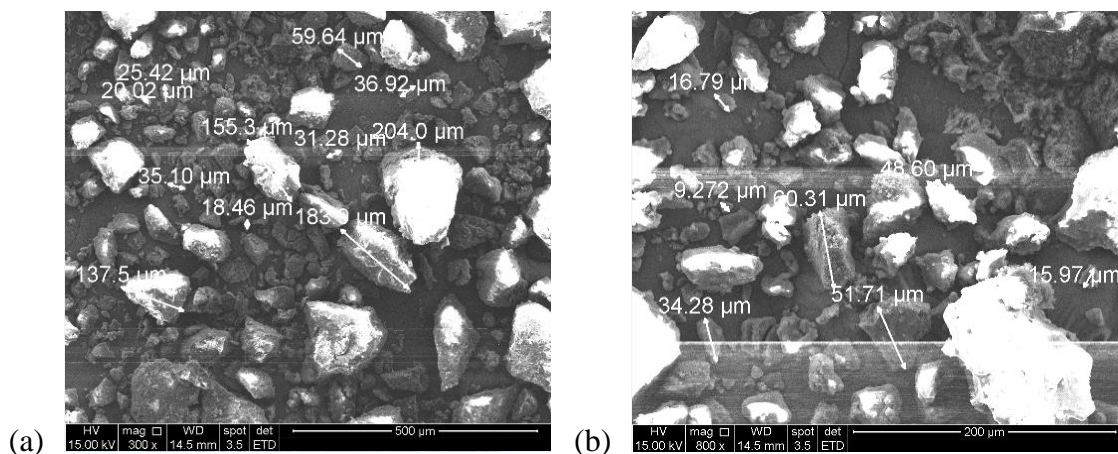


Figura 3.2- MEV da cera, mostrando ampla distribuição de tamanho, com variação de 9 a 204 μm .

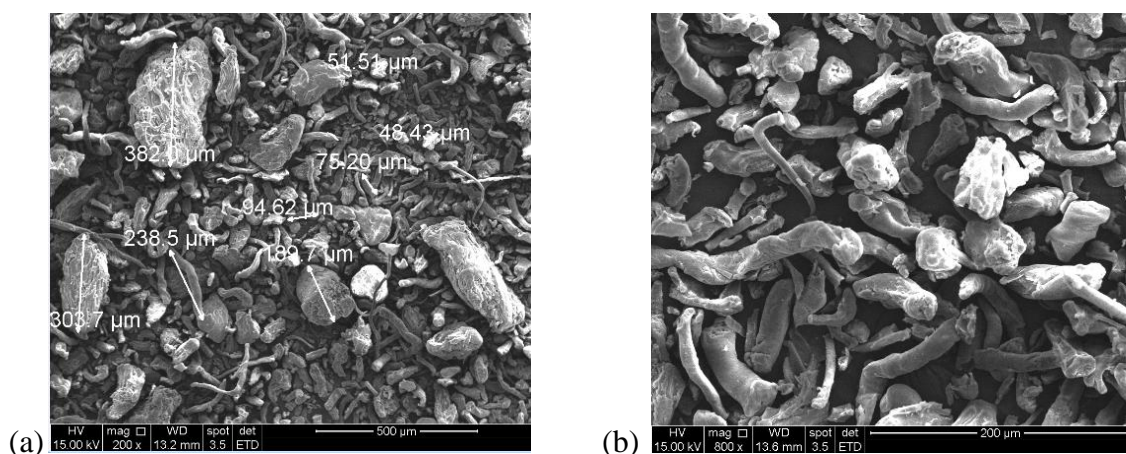


Figura 3.3- MEV do CMC, com distribuição de tamanho de 28 até 382 μm .

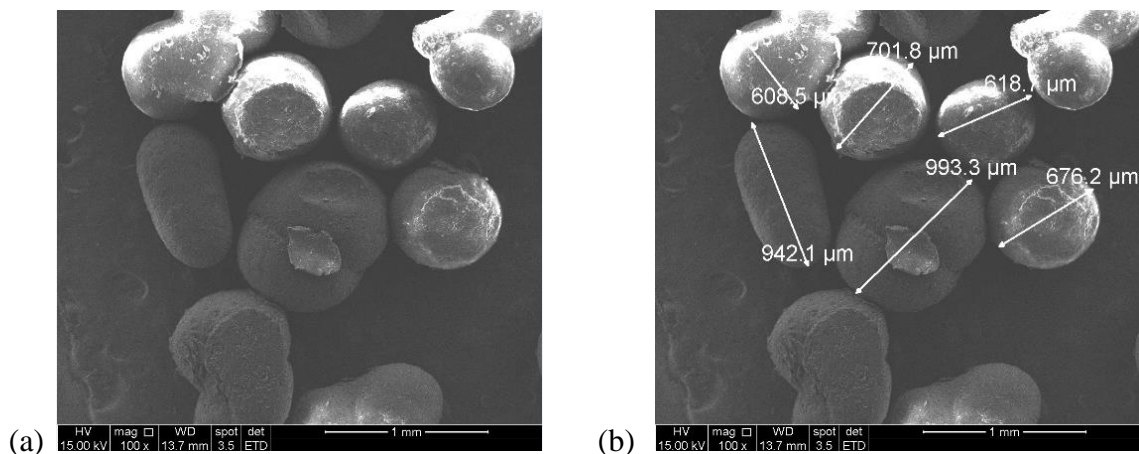


Figura 3.4- MEV da parafina 1, com distribuição de tamanho de 609 até 993 μm .

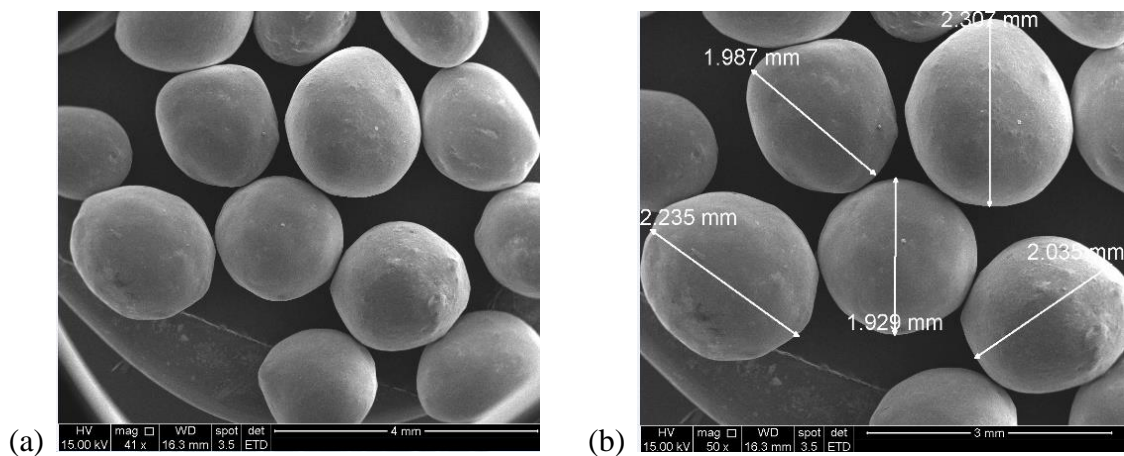


Figura 3.5- MEV da parafina 2, com distribuição de tamanho de 1,9 até 2,3mm.

As Figuras 3.6 e 3.7 mostram os *scaffolds* antes do tratamento térmico.



Figura 3.6- Imagem dos *scaffolds* preparados com parafina 1 antes do tratamento térmico.



Figura 3.7- Imagem dos *scaffolds* preparados com: (a) parafina 2, (b) CMC mais parafina 1, (c) parafina 1 e (d) cera.

Os *scaffolds* produzidos com adição de CMC associado a parafina, descritos na imagem 3.7 (b) desintegraram-se durante o tratamento térmico. Assim, não foi possível obter amostras viáveis a partir dessa composição de agentes porogênicos.

Os *scaffolds* foram denominados: VBC 700⁰C, VBC 800⁰C, VBC 900⁰C, VBP1 700⁰C, VBP1 800⁰C, VBP1 900⁰C, VBP2 700⁰C, VBP2 800⁰C e VBP2 900⁰C conforme descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Descrição dos *Scaffolds*

SCAFFOLDS	MATERIAL UTILIZADO	TRATAMENTO TÉRMICO
VBC 700°C	Vidro Bioativo com adição de cera como agente porogênico	700°C
VBC 800°C	Vidro Bioativo com adição de cera como agente porogênico	800°C
VBC 900°C	Vidro Bioativo com adição de cera como agente porogênico	900°C
VBP1 700°C	Vidro Bioativo com adição de parafina 1 como agente porogênico	700°C
VBP1 800°C	Vidro Bioativo com adição de parafina 1 como agente porogênico	800°C
VBP1 900°C	Vidro Bioativo com adição de parafina 1 como agente porogênico	900°C
VBP2 700°C	Vidro Bioativo com adição de parafina 2 como agente porogênico	700°C
VBP2 800°C	Vidro Bioativo com adição de parafina 2 como agente porogênico	800°C
VBP2 900°C	Vidro Bioativo com adição de parafina 2 como agente porogênico	900°C

Os *scaffolds* VBC 700°C apresentaram fragilidade ao manuseio, formatos disformes, com o aumento de temperatura de tratamento térmico os *scaffolds* tornaram-se mais

resistentes ao manusear, os VBC 900⁰C mostraram maior facilidade de manuseio e visualmente, formato mais uniforme que os VBC 700⁰C e VBC 800⁰C. Os VBP1 700⁰C, VBP1 800⁰C e VBP1 900⁰C demonstraram comportamento ao manuseio e formato mais uniforme que os demais *scaffolds*, o VBP1 700⁰C com formato menos uniforme e com maior dificuldade de manusear, maior facilidade de fratura que os VBP1 800⁰C e VBP1 900⁰C. Os VBP2 700⁰C, VBP2 800⁰C e VBP2 900⁰C apresentaram baixa resistência ao manuseio, com maior dificuldade de manuseá-los, em relação aos demais *scaffolds*.

Caracterizações por MEV e μ CT dos *scaffolds* produzidos foram realizadas para seleção do agente porogênico. O agente porogênico foi selecionado pelo *scaffold* que apresentou melhor distribuição, interconectividade, tamanho, formato de poros e maior resistência ao manuseio.

3.2.2 MEV E EDS DOS SCAFFOLDS OBTIDOS COM DIFERENTES AGENTES POROGÊNICOS.

As análises de MEV dos VBC 700⁰C, 800⁰C e 900⁰C mostraram poucos poros abertos, sendo o eixo da porosidade de 42 a 102 μ m, 55 μ m e 33 a 167 μ m respectivamente. As amostras de VBP1 700⁰C, 800⁰C, 900⁰C mostraram-se, nas imagens de MEV porosas com diâmetro de poros 113 a 1174 μ m, 219 a 1041 μ m e 64 a 595 μ m, respectivamente. As amostras de VBP2 700⁰C, 800⁰C e 900⁰C mostraram-se no MEV com poros muito grandes e abertos, sendo que o tamanho de poro variou de 437 μ m, no *scaffold* tratado a 900⁰C até 1.045 μ m, no *scaffold* tratado a 800⁰C. O formato dos poros dos *scaffolds* foi condizente com o formato dos agentes porogênicos.

O aumento temperatura de tratamento térmico pelas análises de MEV mostra uma diminuição do tamanho dos poros no *scaffold* VBP1 900⁰C em relação aos tratados a 700⁰C e 800⁰C, o mesmo ocorre com o *scaffold* VBP2 900⁰C em relação aos tratados a 700⁰C e 800⁰C. Os *scaffolds* tratados a 900⁰C ainda possuem tamanho de poro favorável a regeneração óssea, isto é, superior a 150 μ m.

A Figura 3.8 ilustra as imagens de MEV dos *scaffolds* VBC 900⁰C, VBP2 800⁰C, com VBP1 700⁰C.

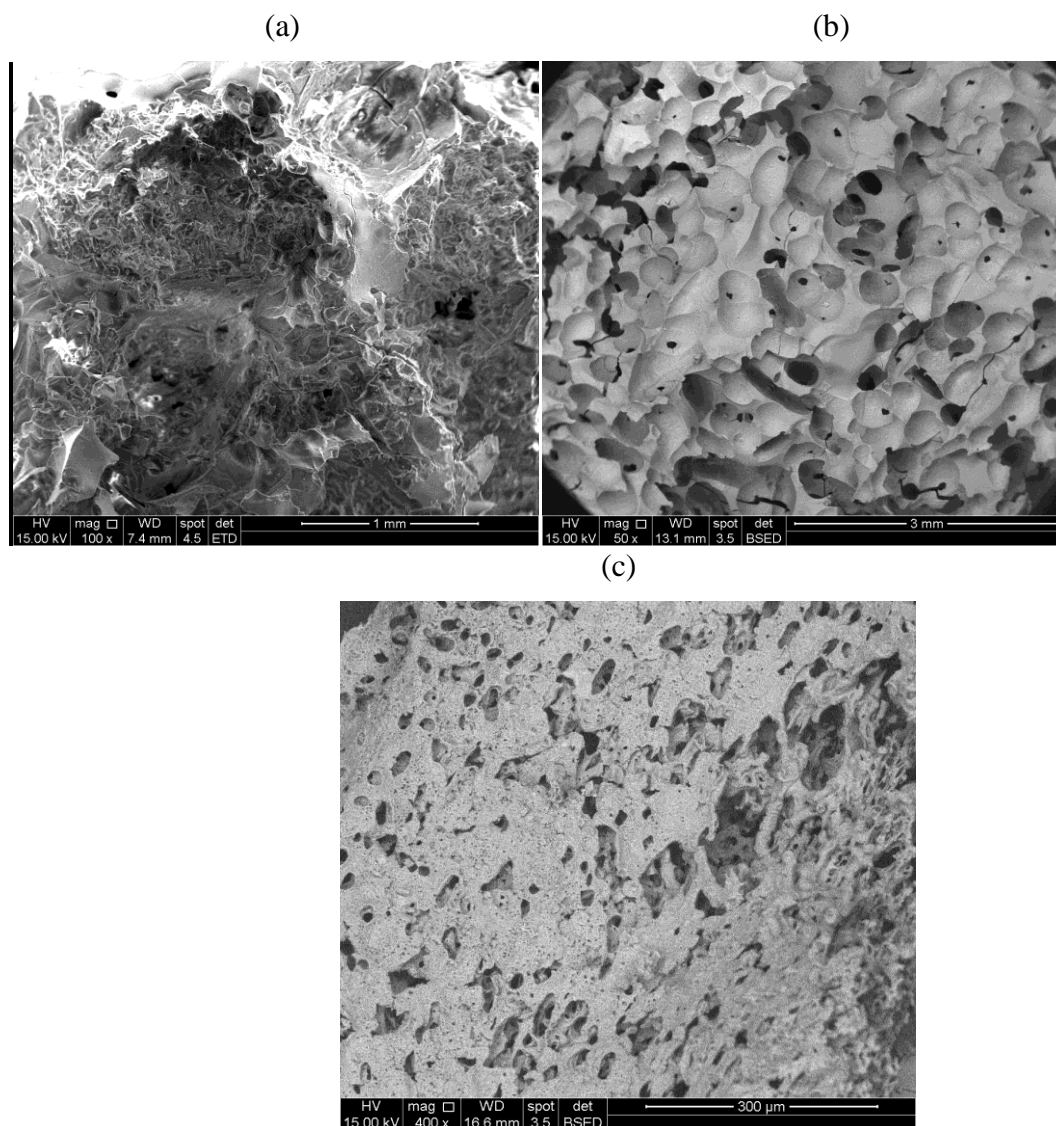


Figura 3.8- Imagem de MEV dos *scaffolds* produzidos com adição de cera, parafina 1 e parafina 2 tratados termicamente. (a) VBC 900⁰C, com aumento de 100x., (b) VBP1 700⁰C com aumento de 50x e (c).VBP2 800⁰C, com aumento de 400x.

Os espectros de EDS de todas as amostras mostraram a presença de silício e oxigênio e foram próximos em todas os *scaffolds*, conforme a Figura 3.9 que é o espectro de EDS do *scaffold* VBC 700⁰C.

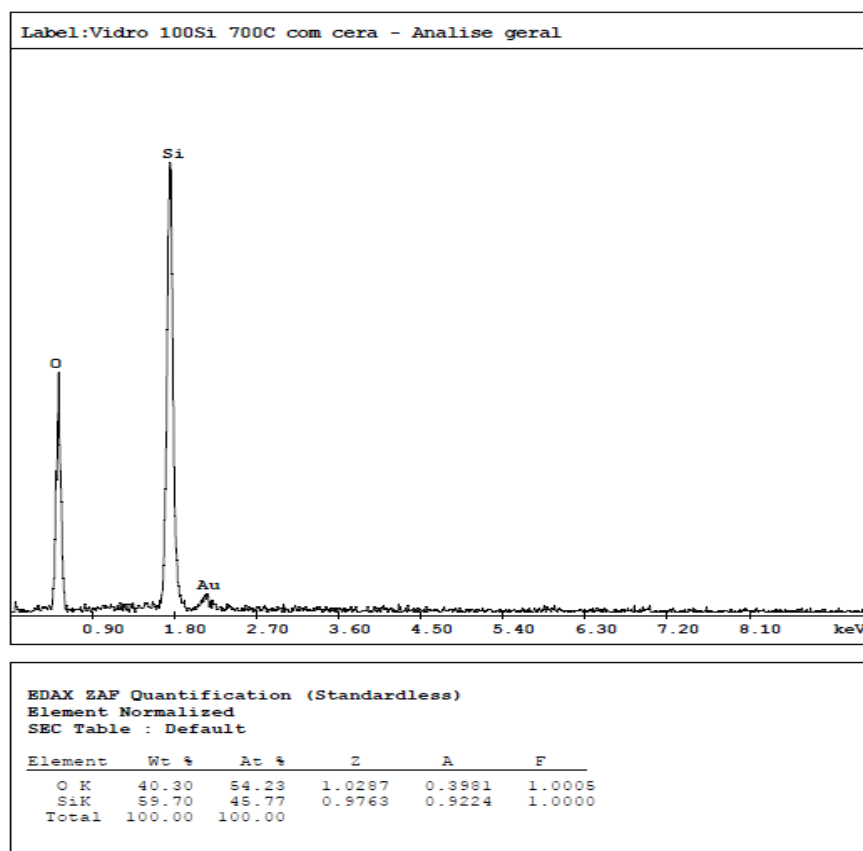


Figura 3.9- EDS do *scaffold* com adição de cera tratados a 700°C.

3.2.3 μ CT DOS *SCAFFOLDS* OBTIDOS COM DIFERENTES AGENTES POROGENICOS.

Os *scaffolds* produzidos com adição de cera, parafina 1 e parafina 2 foram submetidos a análise por μ CT, que mostraram uma média de tamanho de poros muito superior ao observado por MEV, para o VBC tratados a 700, 800 e 900°C: 419 μ m, 411 μ m, 399 μ m, respectivamente. Isso se explica devido a μ CT avaliar o *scaffold* em 3D, além de outras razões variadas, como contração da amostra no MEV, especificações de claro e escuro na μ CT, entre outros. O tamanho dos poros nos *scaffolds* VBC diminuiram com o aumento de temperatura de tratamento térmico. A μ CT para o VBP1 tratados a 700, 800 e 900°C, obteve diâmetros de poros de 442 μ m, 400 μ m e 371 μ m respectivamente, que

também diminuíram com o aumento de temperatura de tratamento térmico. A μ CT dos VBP2 tratados a 700, 800 e 900^oC mostraram diâmetros de poros de 532 μ m, 599 μ m e 594 μ m respectivamente, o aumento de temperatura de tratamento térmico não diminuiu o tamanho dos poros pelas análises de μ CT. Os VBP2, devido ao grande tamanho e quantidade dos poros, os *scaffolds* apresentaram menor resistência ao manuseio em relação aos *scaffolds* produzidos com parafina 1 e cera. Todas as amostras apresentaram quantidade de poros abertos superior a 50%, exceto o VBC 900^oC que apresentou 44% de porosidade. Ressalta-se que foi calculado por μ CT apenas os macroporos, sendo a porosidade total provavelmente maior do que os resultados obtidos nesta caracterização, uma vez que os materiais obtidos pela rota sol-gel apresentam também um grande volume de mesoporos. Os *scaffolds* produzidos além de terem quantidade satisfatória de poros abertos (superior a 50%), apresentaram uma distribuição de tamanho de poros (superior a 150 μ m) condizente para regeneração óssea. As imagens de μ CT (Figura 3.10, 3.11 e 3.12) mostram as diferenças estruturais em 3D e 2D dos VBC, VBP1 e VBP2. O VBC 700^oC apresentou 68% de poros abertos, os poros são interconectados, mas irregulares, o que condiz com o formato do agente porogênico, com uma ampla distribuição de tamanho, sendo o diâmetro médio: 419 μ m. O VBP1 700^oC apresentou 67,4% de poros abertos com formato mais uniforme, condizente com o formato do agente porogênico, os poros são interconectados e com distribuição de tamanho de poros satisfatória, com diâmetro médio de 442 μ m. O VBP2 700^oC apresentou 66% de poros abertos, arredondados, condizentes com o formato do agente porogênico, os poros são inteconectados e o diâmetro médio é de 532 μ m.

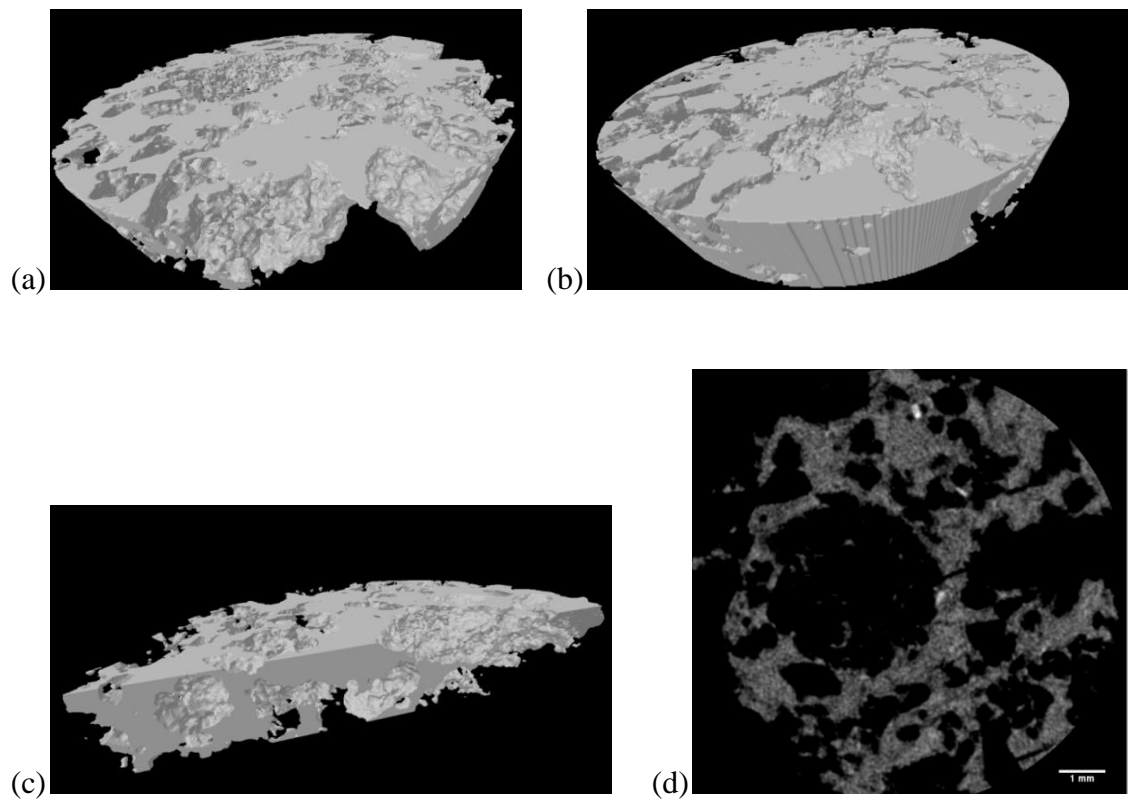


Figura 3.10- μ CT do VBC 700⁰C: (a) *scaffold* em 3D, (b) estrutura de poros em 3D, (c) estrutura interna em 3D, (d) corte 2D.

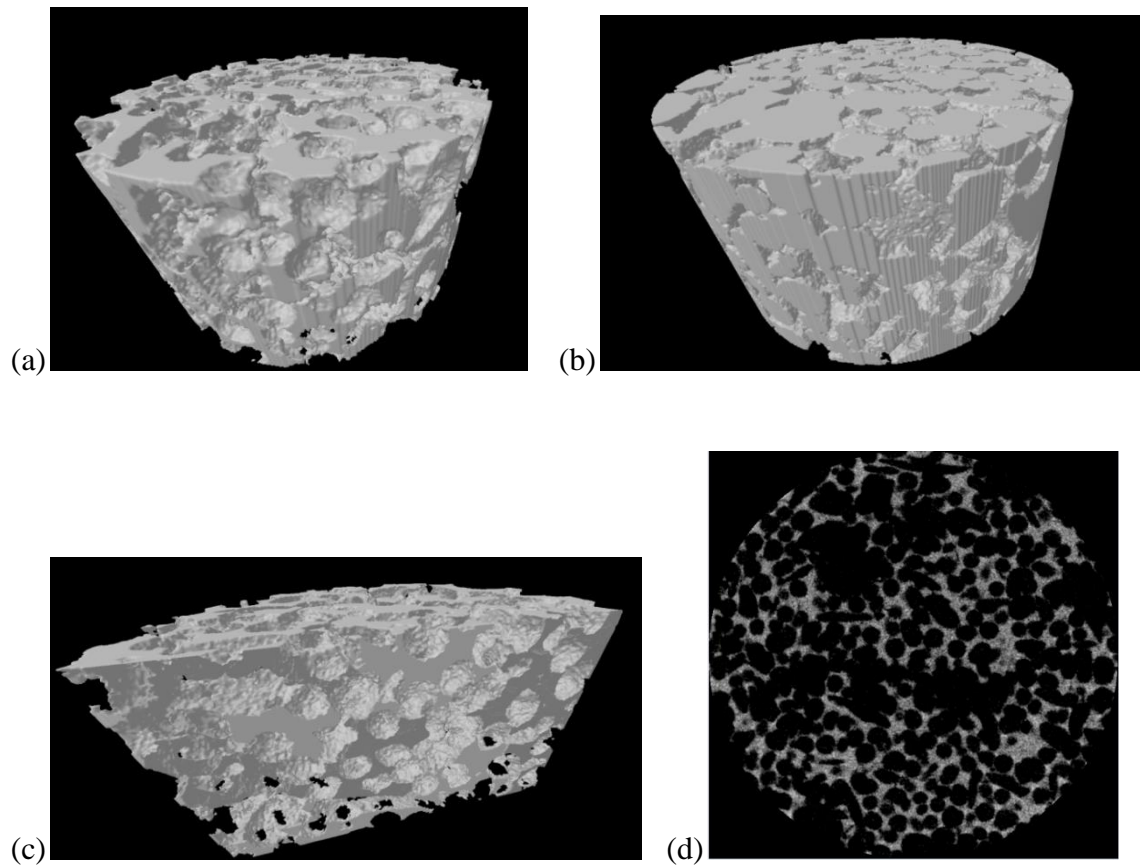


Figura 3.11- μ CT do VBP1 700⁰C: (a) *scaffold* em 3D, (b) estrutura de poros em 3D, (c) estrutura interna em 3D, (d) corte 2D.

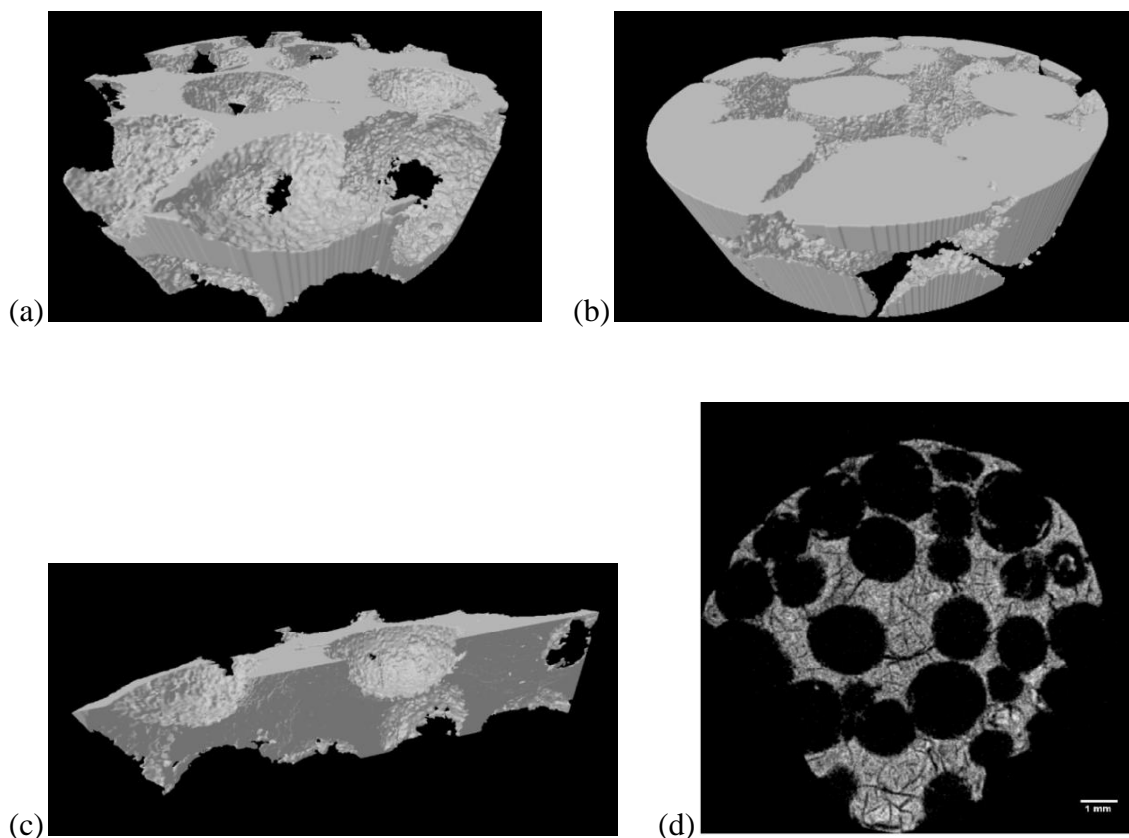


Figura 3.12- μ CT do VBP2 700⁰C: (a) *scaffold* em 3D, (b) estrutura de poros em 3D, (c) estrutura interna em 3D, (d) corte 2D.

As distribuições de tamanho de poros obtidas para os *scaffolds* VBC 700⁰C, VBP1 700⁰C e VBP2 700⁰C são mostradas na Figura 3.13, que mostrou uma média de tamanho de poros de: 419, 442 e 532 μ m, respectivamente. A parafina-1 como agente porogênico permitiu a formação de *scaffolds* com melhor distribuição de tamanho de poros, as caracterizações também permitiram observar que nos *scaffolds* VBP1 os poros são mais interconectados, pré requisitos para que aconteça a regeneração óssea.

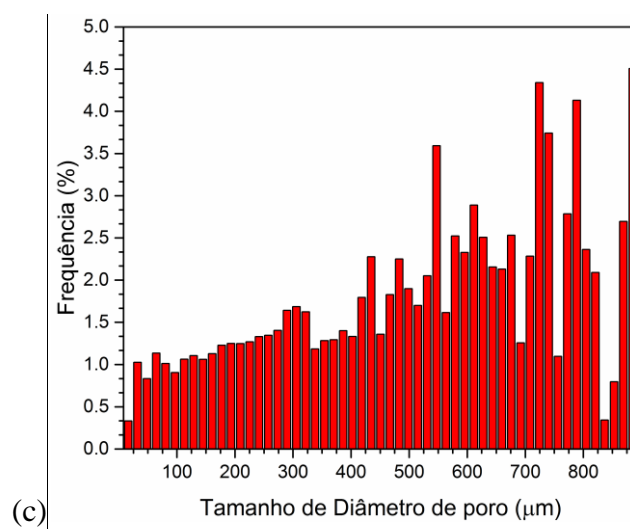
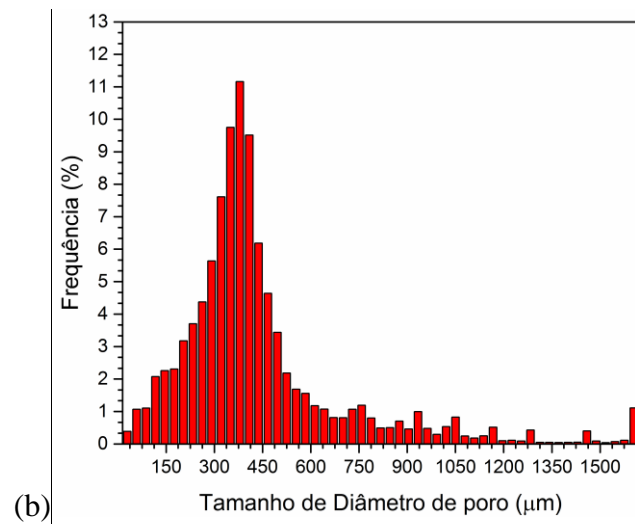
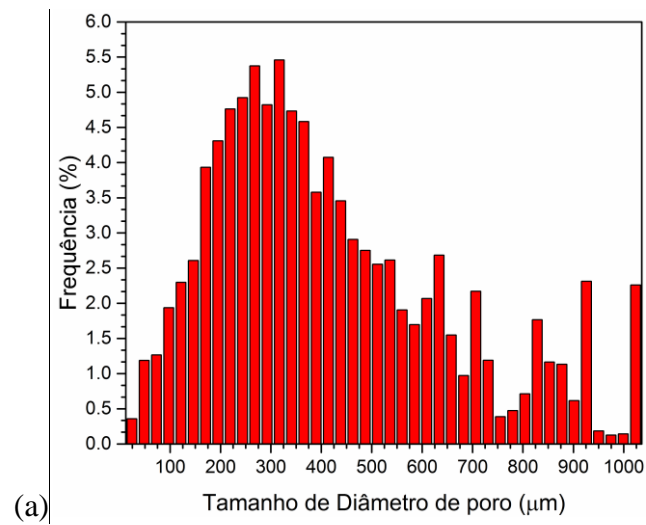


Figura 3.13- Distribuição de tamanho de poros por μ CT: (a) VBC 700^oC, (b) VBP1 700^oC e (c) VBP2 700^oC.

A Tabela 3.3 resume os dados obtidos através das caracterizações estruturais dos *scaffolds*, VBC, VBP1 e VBP2. Os *scaffolds* produzidos com o porogênico cera, tendo este ampla variação de tamanho: 9 a 204 μ m, apresentaram grande variação do maior eixo das porosidades nos *scaffolds*. O formato disforme dos poros condiz com a anatomia do agente porogênico. O aumento de temperatura de tratamento térmico diminuiu o maior eixo dos poros e a porcentagem de poros abertos no VBC 900⁰C.

Os *scaffolds* com adição de parafina 1 em que a variação do tamanho do porogênico foi de 609 a 993 μ m, mostrou distribuição de tamanho de poros relativamente uniforme. O aumento da temperatura de tratamento térmico não diminuiu a porcentagem de poros abertos, mas diminuiu o diâmetro dos poros.

Os *scaffolds* com adição do porogênico parafina 2 com tamanho de 1,9 a 2,3mm apresentaram poros maiores que dos demais *scaffolds*, sendo condizente com o diâmetro maior do agente porogênico. O aumento de temperatura de tratamento térmico apresentou pelas caracterizações por MEV diminuição no tamanho dos poros no VBP2 900⁰C, enquanto o aumento de temperatura de tratamento térmico na μ CT não mostrou diminuição do tamanho dos poros. O VBP2 800⁰C foi o mais poroso dos *scaffolds*.

Tabela 3.3- Diâmetro e porcentagem de poros abertos (obtidos por μ CT e MEV) dos *scaffolds* de VB100S com adição dos agentes porogênicos: cera (C), parafina 1(P1), parafina 2(P2), tratados a 700, 800 e 900^oC e tamanho dos agentes porogênicos.

<i>SCAFFOLDS</i>	PORCENTAGEM TOTAL DE POROS POR μ CT %	PORCENTAGEM DE POROS ABERTOS POR μ CT %	TAMANHO DOS AGENTES POROGÊNICOS μ m	DIÂMETRO DOS POROS POR MEV μ m	DIÂMETRO DOS POROS POR μ CT μ m
VBC 700^oC	72	68	9 a 204	42 a 102	419
VBC 800^oC	74	72	9 a 204	55	411
VBC 900^oC	57	44	9 a 204	33 a 167	399
VBP1 700^oC	67	67	609 a 993	113 a 1.174	442
VBP1 800^oC	68	68	609 a 993	219 a 1.041	400
VBP1 900^oC	70	70	609 a 993	64 a 595	371
VBP2 700^oC	66	66	1.900 a 2.300	1.000	532
VBP2 800^oC	79	79	1.900 a 2.300	756 a 1.045	599
VBP2 900^oC	66	66	1.900 a 2.300	438 a 989	594

3.3 CONCLUSÕES

A partir dos resultados conclui-se que é possível adicionar agentes porogênicos ao VB obtido via sol-gel para produzir porosidade em *scaffolds* de engenharia de tecidos ósseos.

Os *scaffolds* produzidos com cera apresentaram quantidade de poros abertos superior a 68% nos *scaffolds* tratados a 700⁰C e 800⁰C e nos *scaffolds* tratados a 900⁰C a quantidade de poros abertos foi de 44%. O tamanho dos poros, obtidos por MEV, nas amostras tratadas a 700⁰C foi de 42 a 102 μ m, por μ CT a média de tamanho de poros foi 419 μ m, um diâmetro muito maior, que pode ser justificado pela caracterização por μ CT analisar o volume da amostra em 3D. As amostras tratadas a 800⁰C tiveram o tamanho de até 55 μ m medido por MEV, mas, por μ CT, a média de tamanho de poro foi de 411 μ m. As tratadas a 900⁰C tiveram variação do tamanho de poro de 33 a 167 μ m por MEV e média de tamanho de poros 399 μ m por μ CT .

Os *scaffolds* produzidos com adição de parafina 1 apresentaram interconectividade e formato de poros satisfatórios e tamanho de poros por MEV na ordem de 113 a 1.174 μ m nos *scaffolds* tratados a 700⁰C. O tamanho dos poros variou de 219 a 1.041 μ m nos *scaffolds* tratados a 800⁰C e de 64 a 595 μ m nos *scaffolds* tratados a 900⁰C. A μ CT mostrou um tamanho de poros de 442, 400 e 371 μ m nos VBP1 700⁰, 800⁰ e 900⁰C.

Os *scaffolds* com adição de parafina 2 apresentaram poros maiores da ordem de 437 μ m, nos *scaffolds* tratado a 900⁰C até 1.045 μ m, nos *scaffolds* tratado a 800⁰C, abertos e com interconectividade, por μ CT a média de tamanho de poros foi 532, 599 e 594 μ m nos SVBP1 700⁰, 800⁰ e 900⁰C, devido ao grande tamanho e quantidade dos poros, os *scaffolds* apresentaram menor resistência ao manuseio em relação aos *scaffolds* de parafina 1.

O único *scaffold* com porosidade inferior a 50% foi o SVBC tratado a 900⁰C, que obteve 44% de poros abertos, assim concluí-se que é possível adicionar agentes

porogênicos ao VB obtido via sol-gel e obter *scaffolds* com poros interconectados porosidade, tamanho e distribuição de poros favoráveis a regeneração tecidual óssea.

CAPÍTULO 4

4 CONFEÇÃO DOS SCAFFOLDS 58S e 100S COM O AGENTE POROGENICO ESCOLHIDO E VARIAÇÃO NA TEMPERATURA DE SINTERIZAÇÃO 700°C, 800°C E 900°C.

As análises dos resultados obtidos com diferentes agentes porogênicos, considerando integridade das amostras, tamanho e distribuição de tamanho de poros, permitiu selecionar o agente porogênico parafina-1 para a continuidade desse estudo. Assim, o objetivo deste capítulo foi confeccionar *scaffolds*, adicionando a parafina 1, como agente porogênico, ao VB 58S (58%SiO₂-33%CaO-9%P₂O₅ em porcentagem mássica) e 100S (100%SiO₂ em porcentagem mássica), obtido via sol-gel e avaliar os efeitos que uma mudança na temperatura de tratamento nos *scaffolds* de VB provocam na sua cristalinidade.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 SÍNTESE DOS SCAFFOLDS DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES COM ADIÇÃO DO AGENTE POROGENICO PARAFINA 1

Vidros bioativos de duas composições foram então sintetizados: VB58S (58%SiO₂-33%CaO-9%P₂O₅ em porcentagem mássica) e VB100S (100%SiO₂ em porcentagem mássica). Para o VB58S foram usada os seguintes reagentes: 132,2ml de água deionizada, 22,04ml de ácido nítrico 2N– *Synth*, 13,75ml de trietilfosfato (TEP) - *Aldrich*, 137,1ml de tetraetilortosilicato (TEOS) - *Aldrich* e 85,01g nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂·4H₂O) –*Synth*. A Figura 4.1 resume a síntese do VB. Foram adicionados em um béquer água deionizada e ácido nítrico. Em seguida foram adicionados o TEOS e TEP e mantida a agitação por 60 minutos. O nitrato de cálcio foi adicionado aos poucos à mistura, a agitação foi mantida por mais 30 minutos. Para o VB100S usou-se: 220,4ml de água deionizada, 36,7ml de ácido nítrico 2N (HNO₃) – *Synth*, e 228,6ml de

tetraetilortosilicato (TEOS) - *Aldrich*. Foram adicionados em um béquer água deionizada e ácido nítrico. Em seguida foi adicionado o TEOS e mantida a agitação por 60 minutos. O sol resultante foi misturado com o agente porogênico (50% de massa por volume, para o 58S e 55% de massa por volume para o 100S), e 5% de HF - *Merck* (v/v do sol, como catalisador de gelificação) foi adicionado. A mistura foi colocada em recipientes de teflon, fechados hermeticamente com a tampa lisa e porcas de teflon, e então colocados na estufa para gelificação e envelhecimento a 60°C por 72 horas. Para a secagem as tampas foram trocadas por tampas com furos e fechadas com as porcas de teflon. Os recipientes foram colocados na estufa a 60°C e a temperatura foi elevada em 10°C a cada 24 horas até atingir a temperatura de 120°C e mantida por mais 24 horas. Os *scaffolds* (VB58S e VB100S) obtidos após secagem foram colocados para tratamento térmico, a 700, 800 e 900°C com taxa de aquecimento de 1°C por 1440 minutos. As amostras foram descritas conforme mostrado na Tabela 4.1.

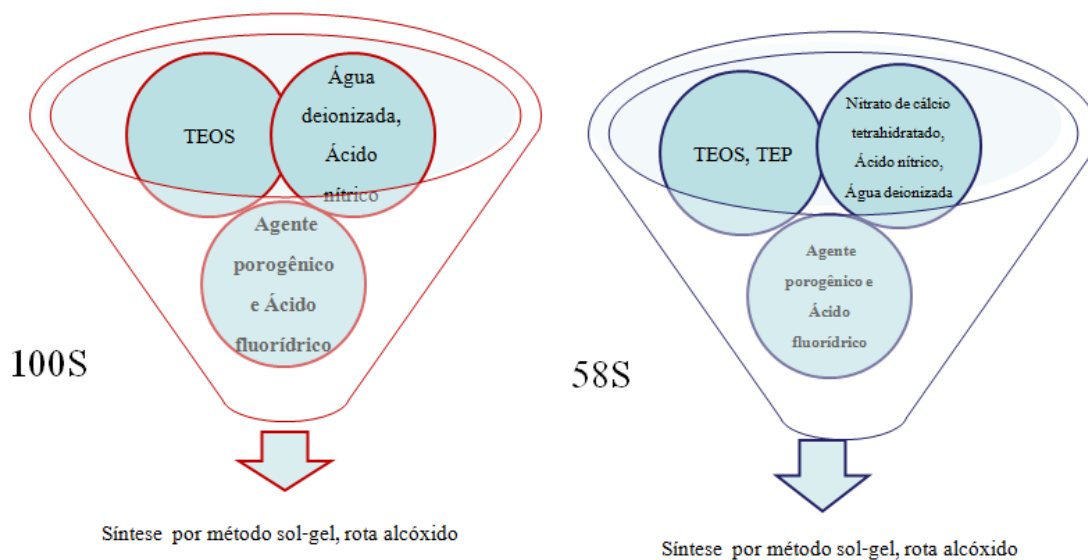


Figura 4.1- Esquema da síntese VB.

Tabela 4.1- Amostras dos *Scaffolds* de VB 58S e 100S.

AMOSTRAS	%SiO₂ EM PORCENTAGEM MÁSSICA	TEMPERATURA DE TRATAMENTO TÉRMICO
VBP158S-700⁰C	58%	700 ⁰ C
VBP158S-800⁰C	58%	800 ⁰ C.
VBP158S-900⁰C	58%	900 ⁰ C
VBP1100S-700⁰C	100%	700 ⁰ C
VBP1100S-800⁰C	100%	800 ⁰ C
VBP1100S-900⁰C	100%	900 ⁰ C

4.1.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS *SCAFFOLDS*.

Os *scaffolds* foram analisados por Microscopia Óptica (MO) em Microscópio de polarização trinocular marca Leica DM 2500 para determinar a morfologia dos poros.

A morfologia e composição química dos *scaffolds* foram observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS), utilizando o equipamento FEI-INSPECT S50, operando a 20kV equipado com um espectrômetro de energia dispersiva (EDS) da EDAX Genesis.

Foi realizada Difração de Raios-X (DRX) no equipamento PW9710mpd, da Philips, usando radiação CuK α ($\lambda = 1,54056\text{Å}$) à 40kV e 30mA. A análise foi conduzida com ângulo 2θ variando de 3,00° a 90,00° com passo de 0,06° e tempo de coleta de 1s.

Para avaliação morfológica foi realizada Microtomografia Computadorizada (μ CT) que permitiu avaliar tamanho, distribuição e interconectividade dos poros, foi realizada por aparelho Skyscan 1174 (Aartselaar, Bélgica), equipado com câmera de 1,3mega pixel, utilizando-se fonte de 50kV e corrente de 800 μ A com resolução de 14 μ m. Foi utilizado filtro de alumínio com 1mm de espessura. As amostras foram fixadas em um suporte, e rotacionadas 180⁰, com imagens adquiridas a cada 0,7⁰. Após o escaneamento, cortes transversais foram reconstruídos em estruturas tridimensionais utilizando-se software SkyScan para análise.

As análises por Adsorção de nitrogênio, BET (análises de área de superfície por isoterma Brunauer, Emmett e Tallor) foram realizadas utilizando um equipamento Quantachrome NovaWin, version 10.01 e permitiram a determinação da área superficial total, o volume de poros e distribuição de meso e microporos.

4.1.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DOS SCAFFOLDS.

A citotoxicidade dos *scaffolds* foi avaliada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (sal de tetrazólio), que analisa quantitativamente a redução do sal de tetrazolium (MTT) pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase presente nas mitocôndrias. A formação de um produto final de cristais de formazan são mensurados em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm. Esse ensaio é usado especificamente para avaliar a funcionalidade mitocondrial e proliferação celular.

Os Ratos Wistar neonatos (1 a 5 dias), fêmeas, utilizados para este estudo foram obtidos a partir do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO). O estudo está em conformidade com o Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório publicado pelo 'National Institutes of Health' dos EUA (NIH publicação n ° 85-23, revista em 1996). Os osteoblastos foram extraídos de calvária de 5 ratos neonatos. Os animais foram sacrificados e suas calvárias foram retiradas e cortadas em

fragmentos de 2mm/2mm, esses fragmentos foram colocados em 1 tubo falcon contendo tripsina 1 % e foram levados para estufa a 37⁰C e 5% de CO₂ por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi colocado 0,06g de colagenase tipo 2 em 30ml de DMEM sem soro e colocado por 30 minutos a 37⁰C. O sobrenadante foi descartado e foi colocado mais DMEM e colagenase e retornado para estufa por mais 20 minutos. O falcon com o material foi centrifugado por 5 minutos, 1400rpm. O sobrenadante foi recolhido e colocado na garrafa de cultura T25 com 5ml de meio DMEM complementado com soro fetal bovino (SFB). Foram feitas mais 2 digestões de 20 minutos.

Os osteoblastos da segunda passagem foram tripsinizados e plaqueados (3x10⁴células/poço) em placas de 24 poços. Após 24 horas, o meio foi aspirado, colocado um meio de cultivo fresco e as populações celulares foram expostas a 1mg/mL de biomaterial. O método de esterilização foi radiação ultravioleta. Como controle positivo, foi utilizado Triton X-100 à 1%. Como controle negativo, foi utilizado meio de cultivo DMEM complementado com SFB. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=3). Após 24 horas de exposição, todo o meio foi aspirado, sendo colocados 240µL de meio de cultura complementado com SFB em cada poço. Foram acrescentados 170µL de MTT (5mg/mL) em cada poço, seguido por uma incubação de 4 horas a 37⁰C e 5% de CO₂. Em seguida foram colocados 170µL de solução de SDS/10% HCl. A placa foi incubada à 37⁰C e 5% CO₂ por 18 horas. Então, foram retirados 100µL de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços plana e a quantificação foi feita em espectrofotômetro (ADAP 1.6, Anthos Labtec Instruments) com filtro de 595nm (análise estatística- One-way / Bonferroni / GraphPad Prism).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.2.1 MO, MEV E EDS DOS *SCAFFOLDS* VB58S E VB100S OBTIDOS COM PARAFINA 1

Todas as amostras produzidas com parafina 1 apresentaram resistência ao manuseio, sendo que a presença do CaO e do P₂O₅ nos VBPI58S fizeram com que estes apresentassem imagem anatômica mais uniforme e maior resistência ao manuseio. O tamanho dos poros, de acordo com o MEV, diminuiu com o aumento de temperatura de tratamento térmico e os poros apresentaram interconectividade em todos os *scaffolds*. A imagem, MO e o MEV do *scaffold* de VB58S tendo como agente porogênico a parafina 1 e tratados a 700⁰C são mostrados na Figura 4.2, A análise de EDS, de todas as amostras, confirmou a presença de cálcio e fósforo, além da sílica nos *scaffolds*, importantes para o aumento da bioatividade do *scaffold*. A Figura 4.3 é o EDS do VBPI58S-700⁰C.

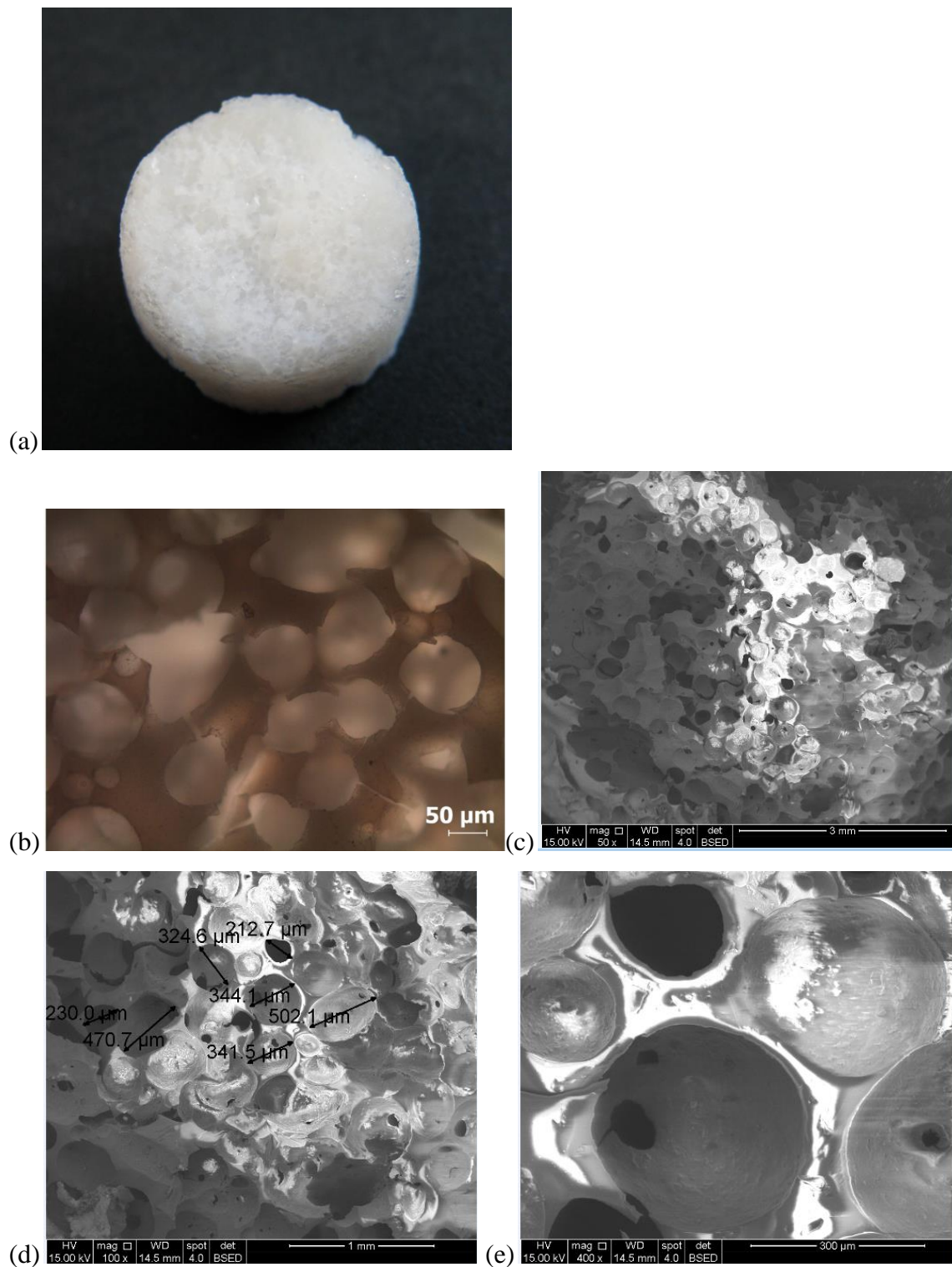


Figura 4.2- (a) Imagem, (b) MO, (c), (d) e (e) MEV do VBPI58S-700⁰C.

A presença do CaO e do P₂O₅ no VBPI58S-700⁰C fez com que diminuísse a média de diâmetro dos poros no *scaffold* em relação ao VBPI100S-700⁰C. O diâmetro dos poros

continuou favorável para regeneração óssea. Enquanto o VBPI58S-700⁰C obteve diâmetro de poros de 213 a 502 μ m o VBPI100S-700⁰C obteve 113 a 1.174 μ m.

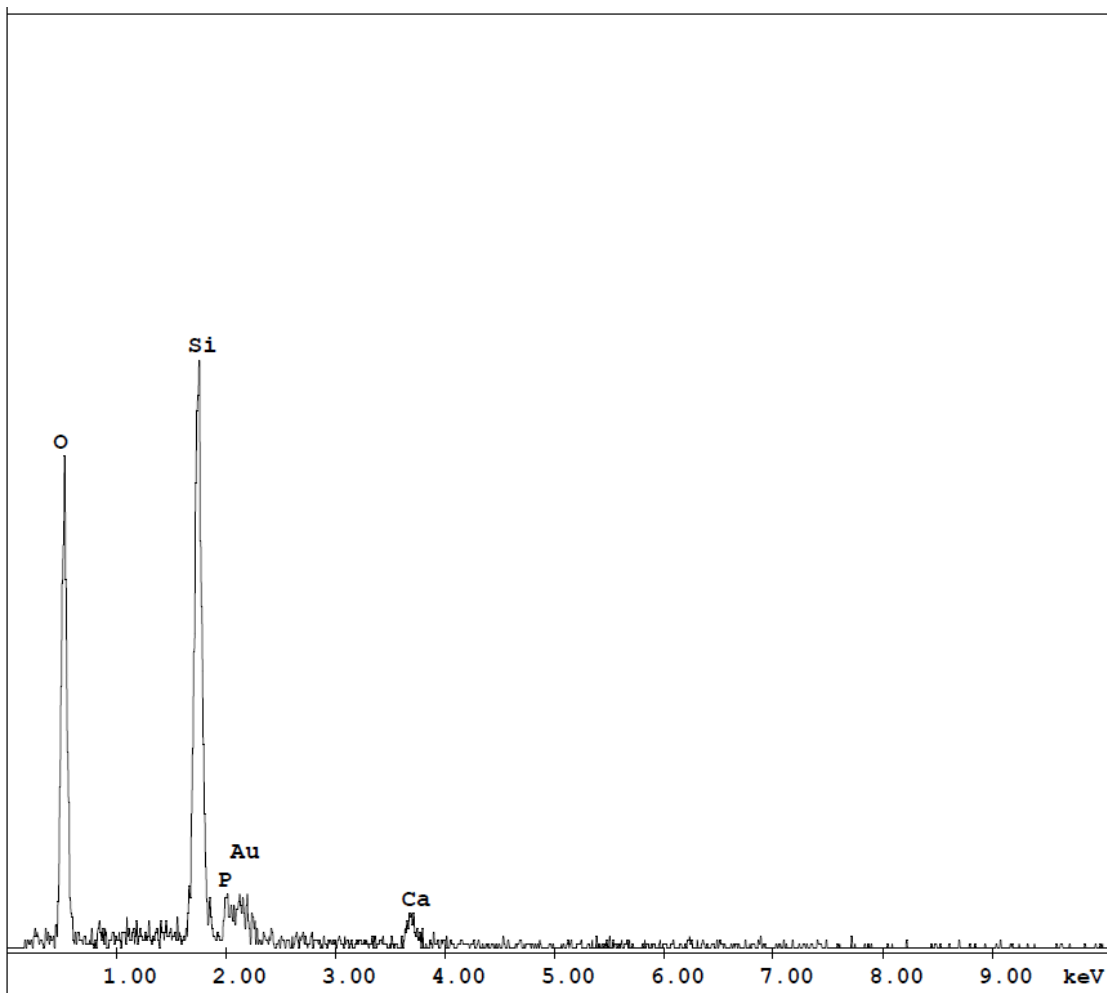


Figura 4.3- EDS do VBPI58S-700⁰C.

A imagem, MO e o MEV do VBPI58S-800⁰C são mostrados na Figura 4.4 e a análise de EDS na Figura 4.5. A presença do CaO e do P₂O₅ no VBPI58S-800⁰C que não estava presente no VBPI100S-800⁰C fez com que os poros diminuíssem de tamanho, enquanto no VBPI58S-800⁰C o tamanho variou de 192 a 430 μ m no VBPI100S-800⁰C foi de 219 a 1.041 μ m.

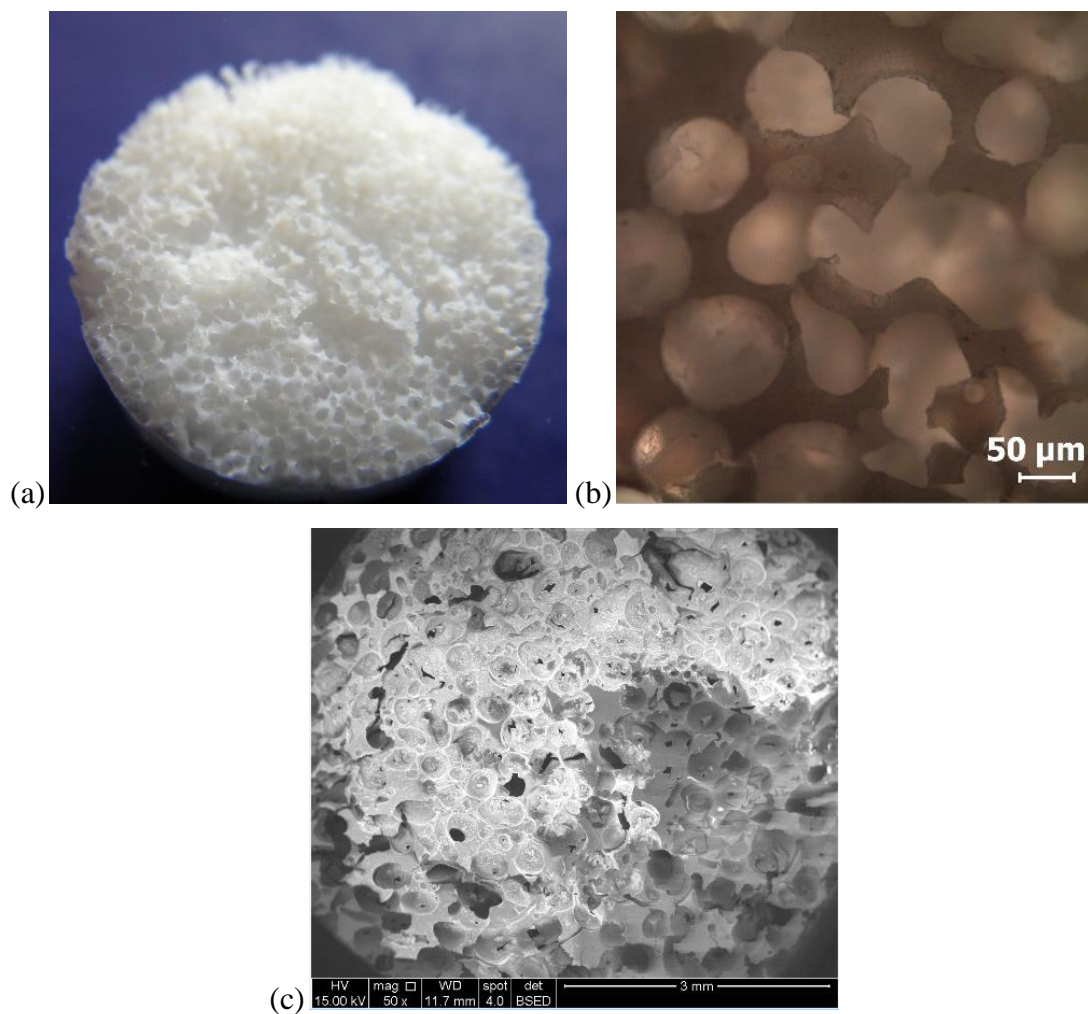


Figura 4.4-(a) Imagem, (b) MO (c) MEV do VBPI58S-800⁰C.

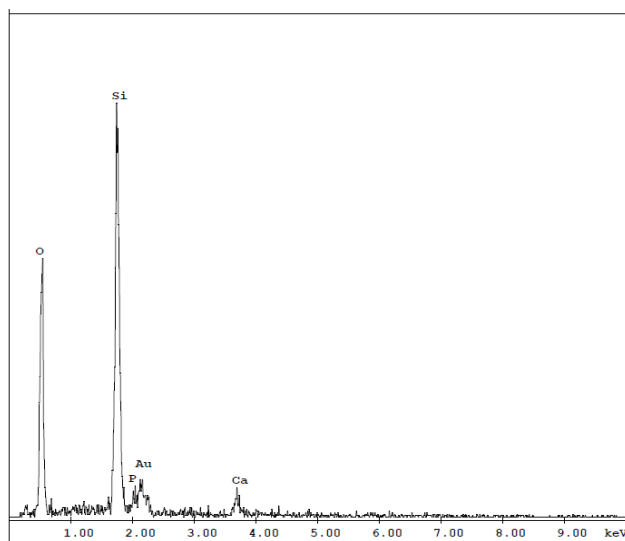


Figura 4.5- EDS do VBPI58S-800⁰C.

Os *scaffolds* de VB58S com adição de parafinal como agente porogênico e tratamento térmico a 900⁰C foram avaliados por MEV, com cortes longitudinais superior e inferior para comparação (Figura 4.6), são mostrados também na Figura 4.6 a imagem de MO do *scaffold*. O EDS (Figura 4.7) avaliou o corte longitudinal superior, inferior e um ponto próximo ao poro do VBPI58S-900⁰C, mostrando a diferença de concentração dos óxidos em áreas diferentes. O VBPI58S-900⁰C diferente dos VBPI58S tratados a 700 e 800⁰C não mostrou grande diferença de tamanho dos poros, embora tenha sido menor que no VBPI100S-900⁰C. O VBPI58S-900⁰C pelas caracterizações de MEV mostrou tamanho de poros de 112 a 454 μ m enquanto no VBPI100S-900⁰C a variação foi de 64 a 595 μ m.

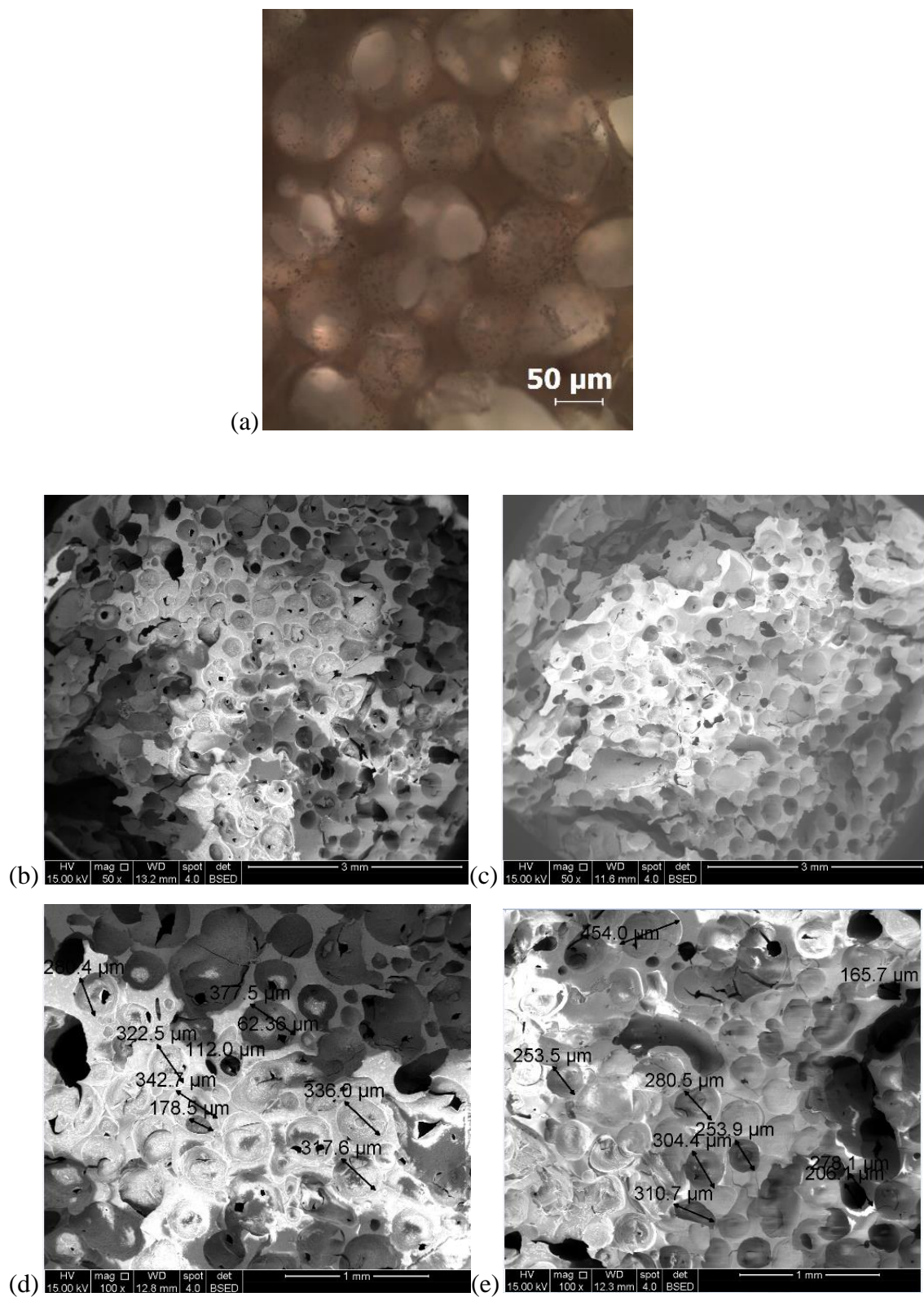


Figura 4.6- (a) Imagem de MO, (b) e (c) Imagem de MEV em cortes longitudinais superior, (d) e (e) cortes longitudinais inferior do VBPI58S-900^oC.

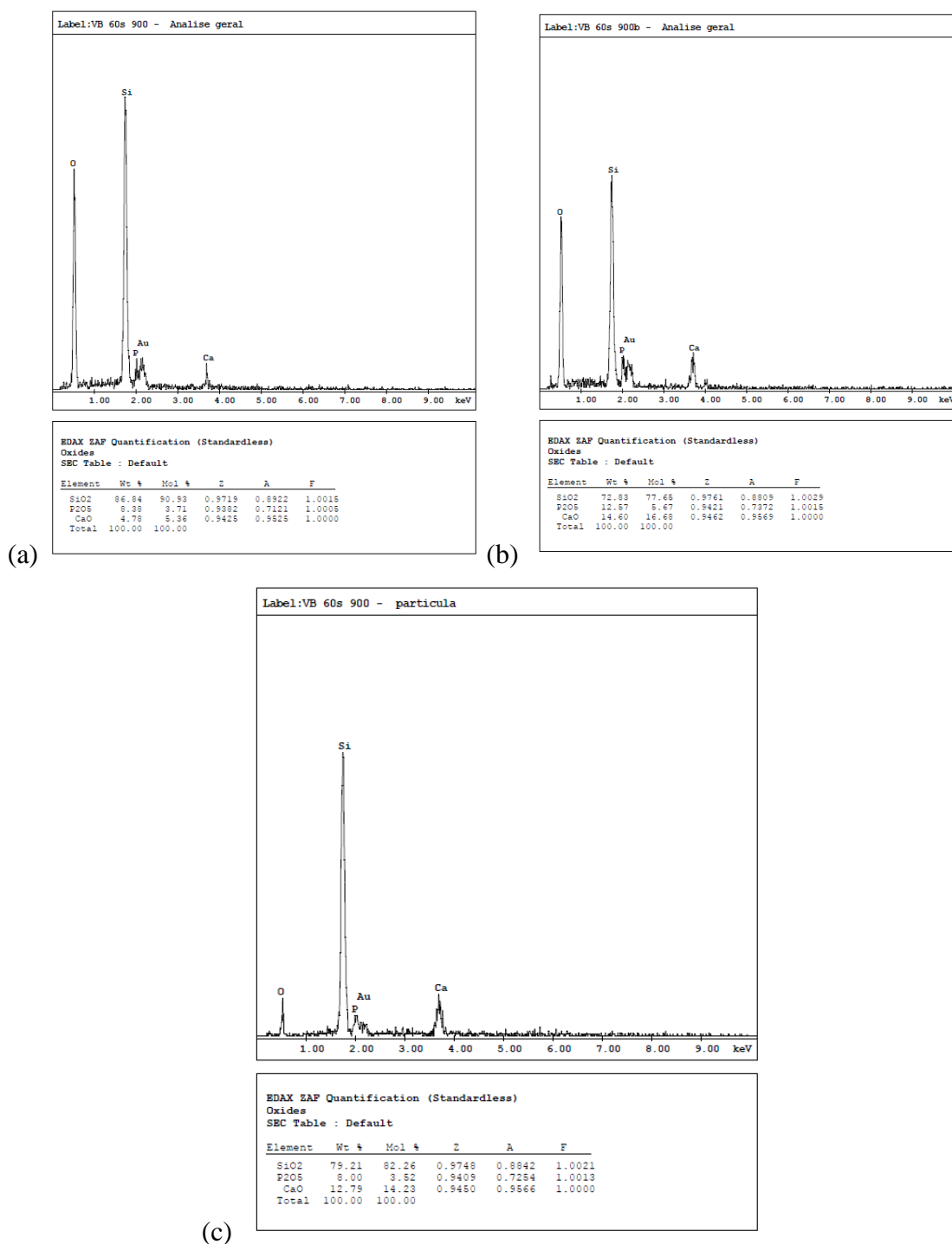


Figura 4.7- EDS do corte longitudinal: (a) superior, (b) inferior, (c) um ponto próxima ao poro do VBPI-900⁰C.

A Figura 4.8, 4.9 e 4.10 são as imagens, imagens de MO e MEV dos *scaffolds* VBP1100S tratados termicamente a 700, 800 e 900⁰C, respectivamente.

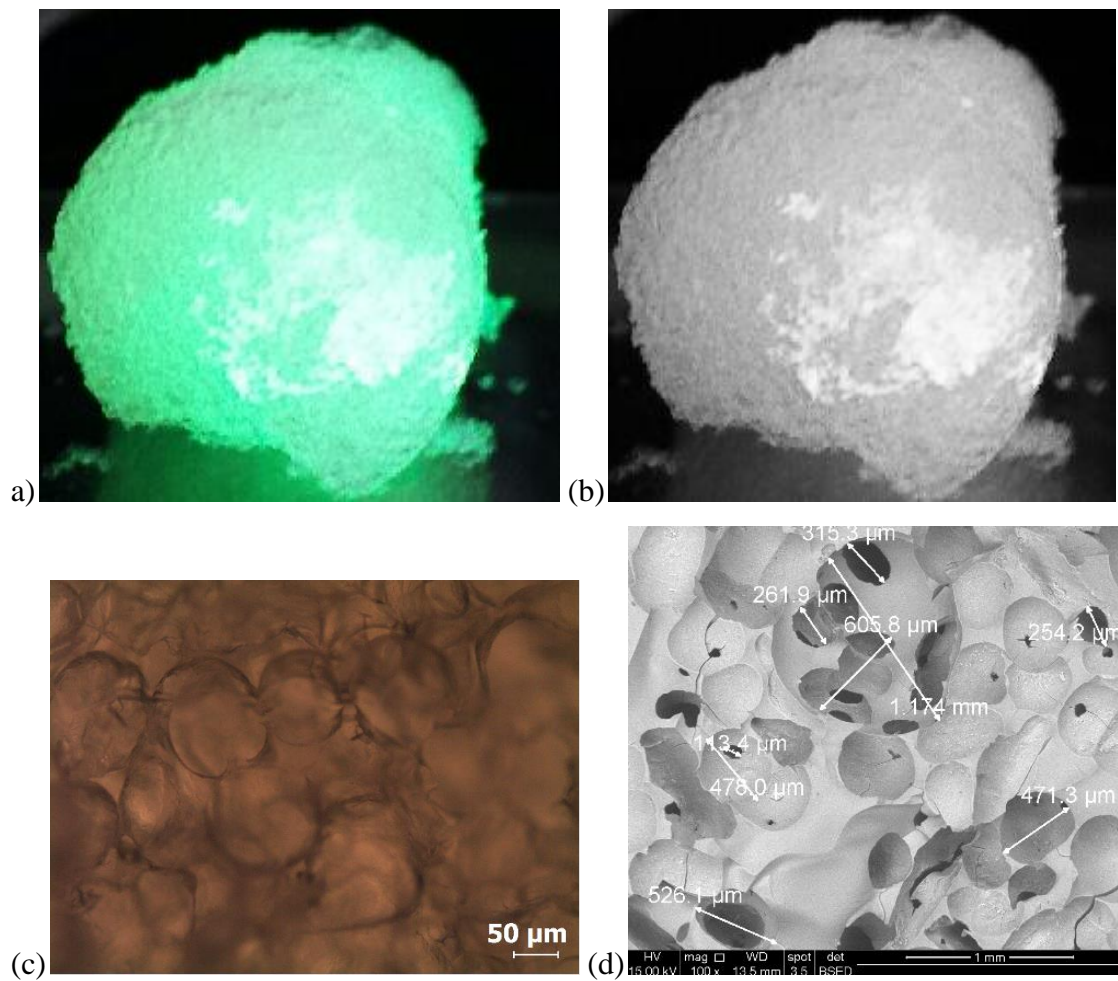


Figura 4.8 (a) e (b) Imagem com a iluminação do MO, (c) MO e (d) MEV do VBPI100S-700^oC.

Os *scaffolds* VBPI100S apresentaram poros interconectados e maiores que dos VBPI58S. Os *scaffolds* com 100% de sílica apresentaram menor resistência ao manuseio

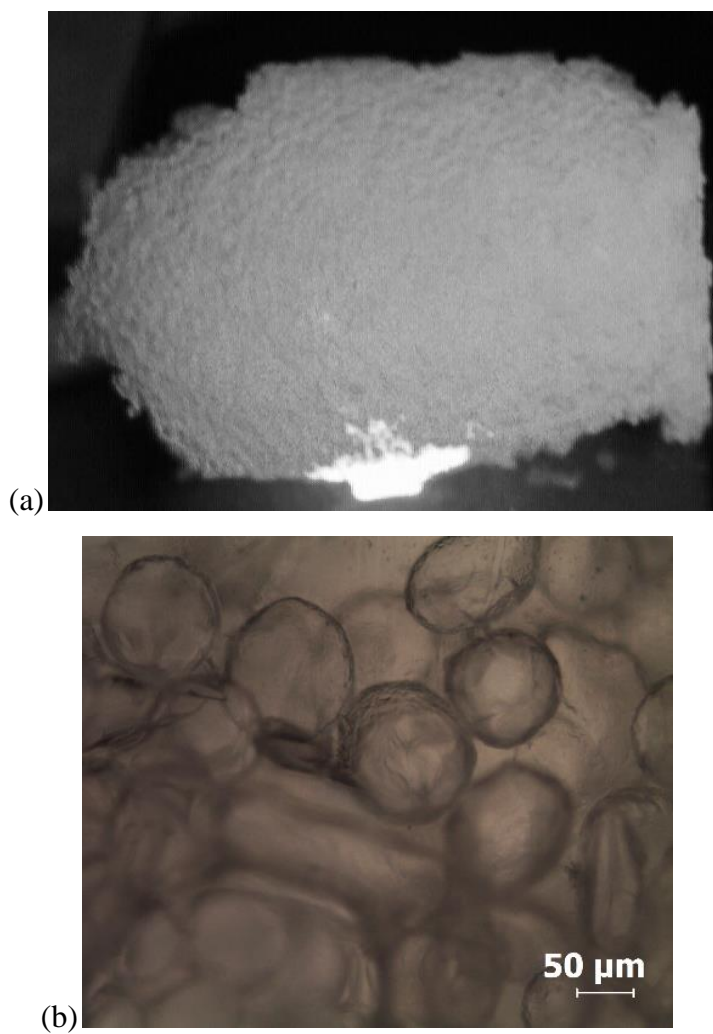


Figura 4.9- (a) Imagem com iluminação do MO, (b) MO do VBPI100-800⁰C.

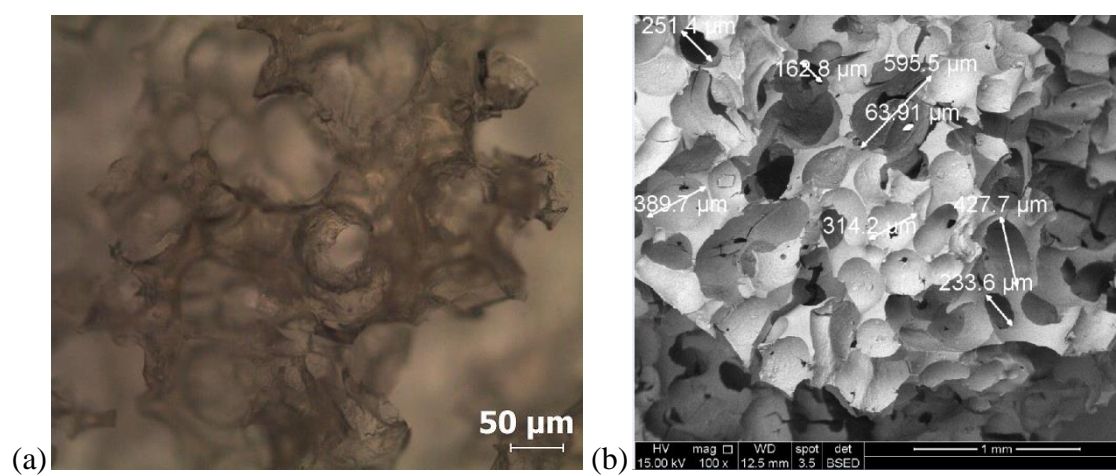


Figura 4.10- (a) Imagem de MO, (b)MEV do VBPI100-900⁰C.

4.2.2 μ CT DOS SCAFFOLDS VB58S E VB100S OBTIDOS COM PARAFINA 1

A análise μ CT permitiu calcular porcentagem e tamanho dos poros dos *scaffolds* através de análises tridimensionais realizadas em software. Deve ser considerado que o cálculo de porosidade considerou apenas os macroporos, sendo a porosidade total provavelmente maior. A quantidade de poros abertos e porosidade total diminuíram com o aumento de temperatura de tratamento térmico nos *scaffolds* de VB58S, nesses *scaffolds* o aumento de temperatura de tratamento térmico refletiu na diminuição da quantidade de poros, tornando as partículas mais densas e com número pouco menor de poros abertos, nos *scaffolds* de VB100S o aumento de temperatura não interferiu na porcentagem de poros abertos, mas o efeito do tratamento térmico, partículas mais densas, fez com que diminuísse o tamanho dos poros.

Pela análise de μ CT do VBP158S-700⁰C obteve-se um diâmetro médio de poro de 269 μ m, para o VBP158S-800⁰C o diâmetro de poros foi de 290 μ m e do VBP158S-900⁰C de 278 μ m. Para o VBP1100S-700⁰C, 800⁰C e 900⁰C os tamanhos médios de poros foram de: 442, 400 e 371 μ m respectivamente. Pelas análises de μ CT, foi possível avaliar o volume, a distribuição, a porcentagem de poros abertos, bem como a interconectividade dos poros. Os *scaffolds* apresentaram quase totalidade de poros abertos, quando se avalia volume total de poros/ volume de poros abertos. A Figura 4.11 mostra a imagem de μ CT do VBP158S-700⁰C em 3D mostrando características estruturais do *scaffold* e rede de poros. Os *scaffolds* apresentaram tamanho médio de poros satisfatórios, de 269 μ m (considerando fator erro e desvio padrão). A porosidade superior a 50% e poros maiores que 150 μ m e interconectados são fatores importantes, pois permitem migração celular, transporte de nutrientes, vascularização e crescimento tecidual (MELCHELS *et al.*, 2009; HELMINEN *et al.*, 2002; RONCA, 2010). O VB100S com adição de parafina 1 apresentou porosidade superior a 67%, com tamanho de poro suficiente para regeneração óssea. O aumento de temperatura ocasionou uma diminuição no tamanho dos poros.

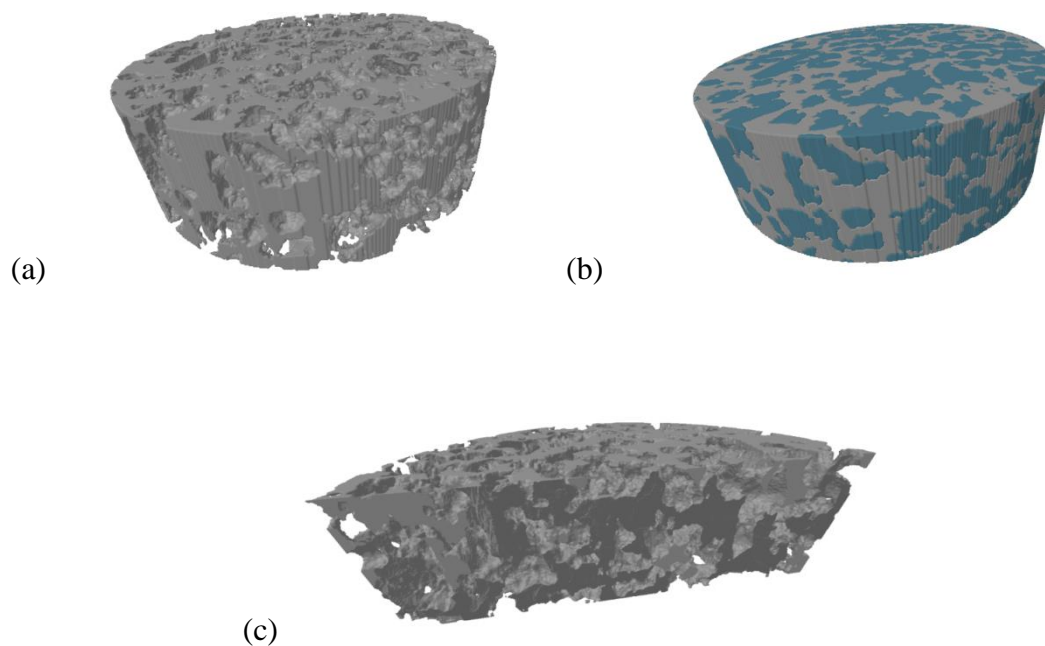


Figura 4.11- Imagens de μ CT do VBPI58S-700⁰C (a) *scaffold* , (b) estrutura de poros e (c) estrutura interna.

As distribuições de tamanho de poros obtidas para os *scaffolds* VB58S tratados a 700, 800 e 900⁰C são mostrados na Figura 4.12. e do VB100S tratados a 700, 800 e 900⁰C na Figura 4.13, observa-se diferença na distribuição dos tamanhos de poros entre os *scaffolds* VB58S e os VB100S, a presença do cálcio e do fósforo nos VB58S fez com que a sua distribuição do tamanho de poros fosse mais homogênea. Os VB100S apresentaram poros maiores ultrapassando 1mm.

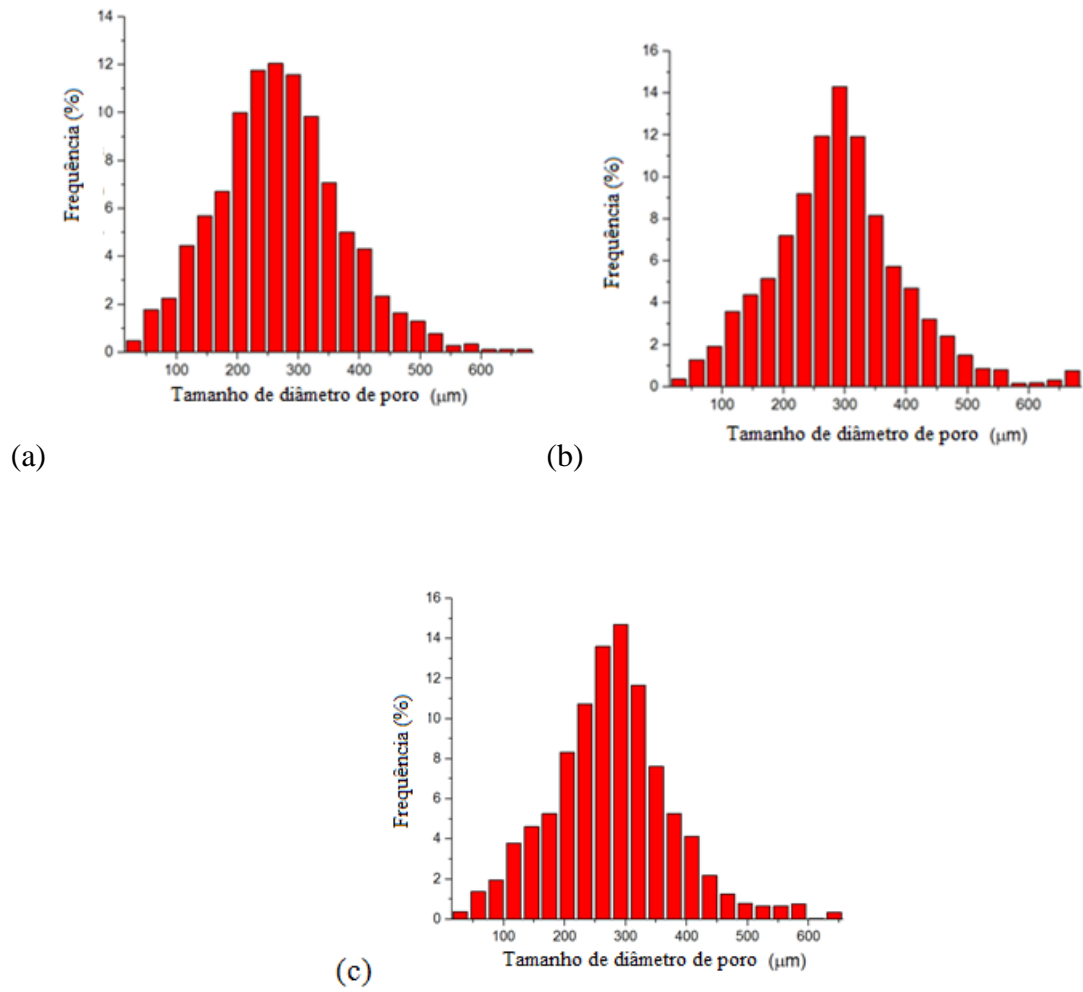


Figura 4.12- Distribuição de tamanho de poros por μ CT: (a) VBPI58S-700 $^{\circ}$ C, (b) VBPI58S-800 $^{\circ}$ C e (c) VBPI58S-900 $^{\circ}$ C.

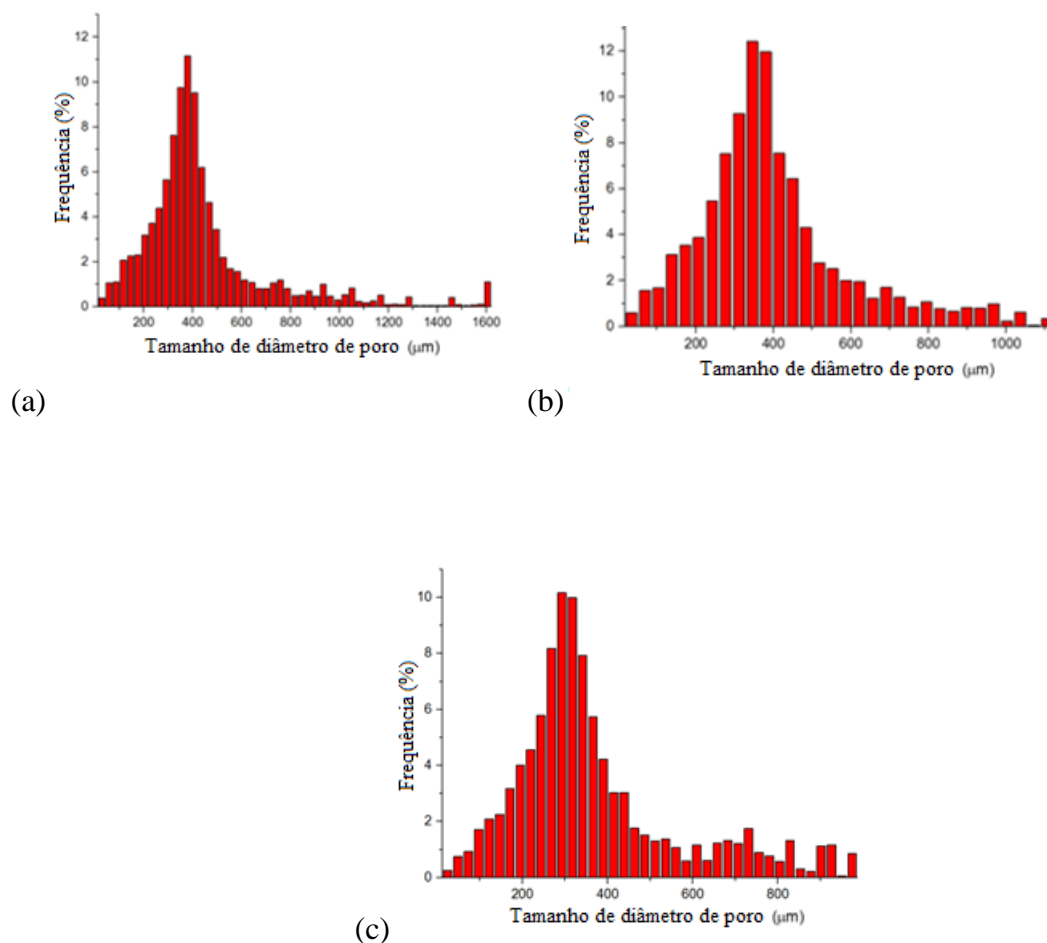


Figura 4.13- Distribuição de tamanho de poros por μ CT: (a) VBPI100S-700⁰C, (b) VBPI100S-800⁰C e (c) VBPI100S-900⁰C.

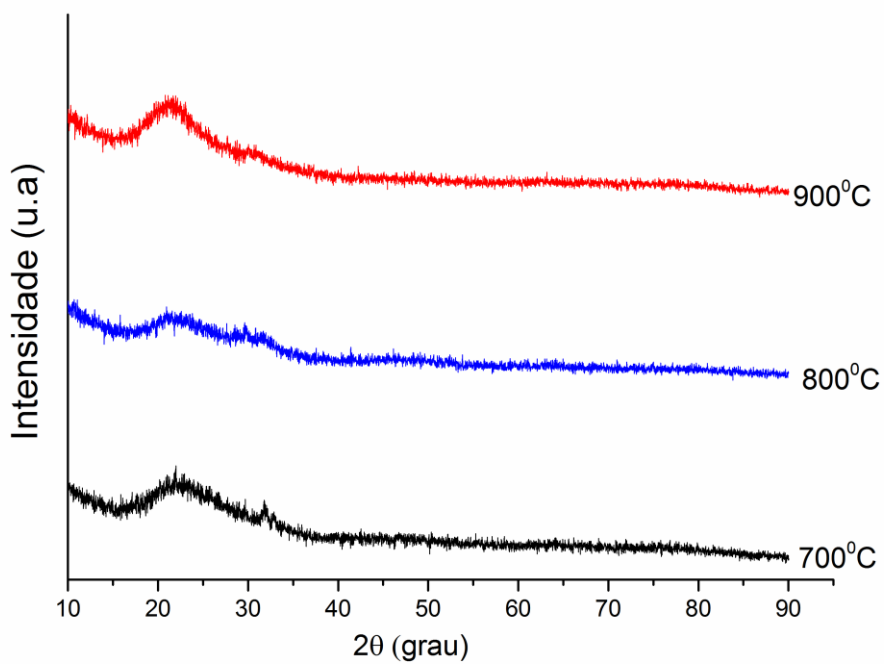
A Tabela 4.2 resume os dados obtidos nas análises estruturais dos *scaffolds* VB58S e VB100S com adição do agente porogênico parafina-1. Os *scaffolds* de VB100S apresentaram porosidade superior, tamanho do poros maiores que os dos *scaffolds* VB58S. A presença do trietilfosfato e do nitrato de cálcio tetrahidratado no VB58S fez com que estes *scaffolds* tornassem mais resistentes ao manuseio, o que condiz com a menor porcentagem de poros abertos e o diâmetro de poro menor em relação ao VB100S, um exemplo é o *scaffolds* VB58S-700⁰C com porosidade de 56,4% e média de tamanho de poro de 269 μ m, enquanto o VB100S-700⁰C obteve porosidade de 67,4% e média de tamanho de poro de 442 μ m.

Tabela 4.2- Diâmetro e porcentagem de poros abertos obtidos por MEV e μ CT dos *scaffolds* de VB58S e VB100S com adição do agente porogênico parafina 1(P1).

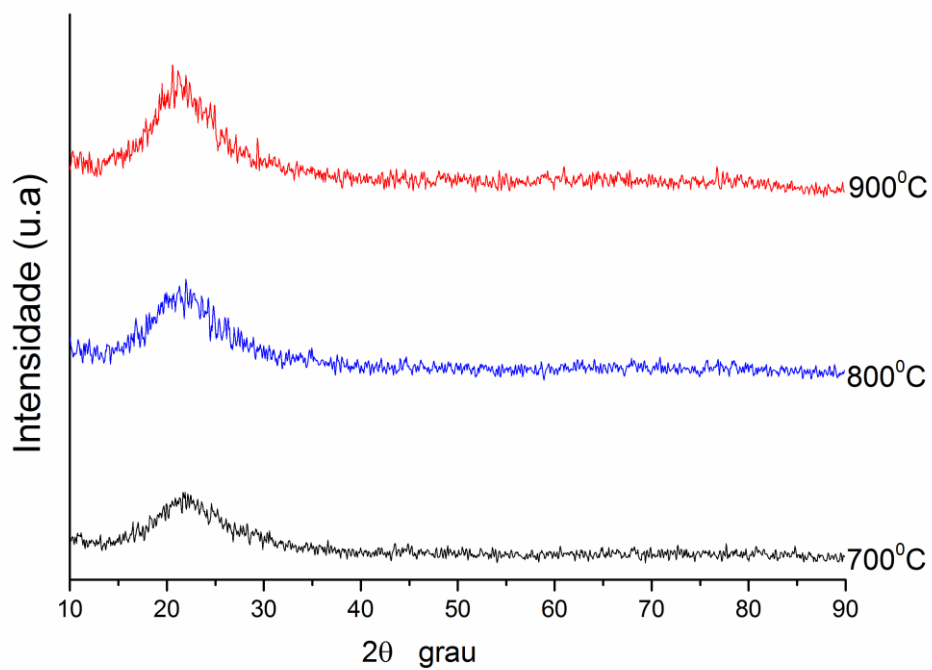
<i>SCAFFOLDS</i>	POROSIDADE TOTAL %	PORCENTAGEM DE POROS ABERTOS %	DIÂMETRO DOS POROS POR MEV	MÉDIA DE DIÂMETRO DOS POROS POR μ CT
VBPI58S-700 ^o C	57	56	213-502 μ m	269 μ m
VBPI58S-800 ^o C	52	52	192-430 μ m	290 μ m
VBPI58S-900 ^o C	51	51	112-454 μ m	278 μ m
VBPI100S-700 ^o C	67	67	113 a 1.174 μ m	442 μ m
VBPI100S-800 ^o C	68	68	219 a 1.041 μ m	400 μ m
VBPI100S-900 ^o C	70	70	64 a 595 μ m	371 μ m

4.2.3 DRX DOS *SCAFFOLDS* VB58S E VB100S OBTIDOS COM PARAFINA 1

A Figura 4.14 apresenta os resultados de DRX dos *scaffolds* do VB58S e 100S com adição de parafina 1e tratamento térmico a 700, 800 e 900^oC. Observam-se poucos picos de cristalinidade, sendo que a definição dos picos, indicaria a cristalização do material, obtendo possivelmente um material mais denso, mais resistente e menos bioativo. O DRX de todas as amostras foram característicos de um material amorfo, sem diferenças significativas em relação a cristalinidade. O resultado obtido é diferente do observado em outros trabalhos, como *scaffolds* de VB obtidos pela técnica da espuma (COELHO, 2003), em que o DRX apresenta picos de cristalinidade com tratamento térmico a 700^oC.



(a)



(b)

Figura 4.14- DRX dos (a) VBPI58S-700⁰C, VBPI58S-800⁰C e VBPI58S-900⁰C e (b) VBPI100S-700⁰C, VBPI100S-800⁰C e VBPI100S-900⁰C.

4.2.3 ADSORÇÃO DE NITROGÊNIO DOS *SCAFFOLDS* VB58S E VB100S OBTIDOS COM PARAFINA 1

As áreas superficiais específicas (SA) foram calculadas por isothermas de adsorção de nitrogênio, que calcularam também o volume e diâmetro de poros. Todos os *scaffolds* foram caracterizados como material mesoporoso (tamanho de poro entre 2-50nm).

A SA foi determinada com o modelo BET, (Brunauer, Emmett e Teller), adsorção física das moléculas de gás sobre superfície sólida em multicamadas. A distribuição de diâmetro de poro foi calculado pelo modelo BJH (Barrett, Joyner e Halenda), aplicado para as curvas de dessorção. Dessorção é preferido a adsorção para estes cálculos, pois acontece em pressão relativa inferior, o qual é considerado melhor para o equilíbrio termodinâmico (RUTHVEN, 1984; OLIVEIRA, 2011). As análises por BET- Isothermas de adsorção/dessorção de nitrogênio das amostras VBP158S-700⁰C, VBP158S-800⁰C, VBP158S-900⁰C, VBP1100S-700⁰C, VBP1100S-800⁰C e VBP1100S-900⁰C confirmaram que os *scaffolds* tem suas superfícies mesoporosas com SA variando de 73,2m²/g no SVBP158S-800⁰C até 331,2m²/g nos SVBP1100S- 800⁰C.

Os *scaffolds* classificados como mesoporosos, como esperado para materiais bioativos obtidos pelo método sol-gel, são bem mais favoráveis do que aqueles completamente densos, porque estes materiais possuem alta área superficial o que resulta em alta bioatividade e elevada tendência à biorreabsorção (COELHO, 2003). As isothermas podem ser identificadas como tipo II as quais são características de materiais mesoporosos. Mesoporosidade é indicado pela presença de histerese de adsorção/dessorção e pela inclinação da curva de adsorção (SING, 1985).

A Tabela 4.3 resume os dados obtidos por BET. O VBP158S-700⁰C apresentou maior SA que o VBP1100S-700⁰C, porém com o aumento de temperatura de tratamento térmico ocorreu o inverso. A maior SA foi encontrada no VBP1100S-800⁰C e a menor

no VBP158S-800⁰C, contudo, as SA foram maiores nos VBP158S e VBP1100S tratados termicamente a 700⁰C em relação aos tratados a 900⁰C. As elevadas SA são características de materiais obtidos por sol-gel. Essas características intensificam a taxa das reações na superfície, conduzindo para uma liberação mais acelerada de espécies iônicas durante a dissolução do material. A SA tem um papel importante na bioatividade de biomateriais. A habilidade do substrato de induzir a formação de uma camada biologicamente ativa de HCA não depende somente da composição química do vidro bioativo mas também da textura produzida pelo processamento sol-gel (COELHO, 2003). O volume de mesoporos no VBP158S diminuiu a medida que a temperatura de tratamento térmico aumentou, enquanto no VBP1100S o volume de mesoporos diminuiu apenas no VBP1100S-900⁰C, sendo o volume de mesoporos maior no VBP1100S-800⁰C. O diâmetro dos mesoporos no VBP158S e 100S foram maiores nas amostras tratadas a 800⁰C e menores nas tratadas a 900⁰C. O volume e o diâmetro de mesoporos tendem a diminuir com o aumento da temperatura de tratamento térmico, como resultado do processo de densificação(COELHO, 2003).

Tabela 4.3- Área superficial específica, volume e diâmetro de poros, determinados por BET- Adsorção de Nitrogênio dos *scaffolds* de VB58S e VB100S com adição do agente porogênico parafina 1(P1).

AMOSTRA	SA (m ² /g)	VOLUME DE PORO (cm ³ /g)	DIÂMETRO DE PORO (nm)
VBP158S-700 ⁰ C	325,5	1,1	13,6
VBP158S-800 ⁰ C	73,2	0,4	21,7
VBP158S-900 ⁰ C	100,6	0,3	13,1
VBP1100S-700 ⁰ C	261,4	1,5	22,3
VBP1100S-800 ⁰ C	331,2	1,9	22,9
VBP1100S-900 ⁰ C	192,3	0,5	9,4

4.2.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DOS *SCAFFOLDS* VB58S E VB100S OBTIDOS COM PARAFINA 1

A atividade metabólica mitocondrial dos osteoblastos primários foi avaliada pelo ensaio de MTT após 24 horas de exposição dos osteoblastos ao material. Esta análise permite mensurar o metabolismo celular com a adição do MTT. As células viáveis absorvem o tetrazólio de metiltiazol e o metabolizam na mitocôndria utilizando enzimas ativas, que se acumulam sob a forma de cristais de tetrazólio ou formazan; sendo possível diferenciar células viáveis das menos viáveis. Quanto maior a leitura no espectrofotômetro, maior é a taxa metabólica (MARTINS, 2013). A Figura 4.15 apresenta a viabilidade relativa das células osteoblásticas primárias, a viabilidade da células osteoblásticas variou de 96,5% no VBP1100S-900⁰C até 145% no VBP158S-900⁰C, conforme a Tabela 4.4., utilizando como controle negativo células cultivadas no meio sem o material, com 100% de viabilidade e como controle positivo células postas no meio de cultura com adição de Triton, substância citotóxica. O aumento de temperatura de tratamento térmico nos *scaffolds* 58S não diminuiu a proliferação celular e sim demonstrou um pequeno aumento da atividade metabólica dos osteoblastos. Os *scaffolds* 100S apresentaram atividade celular satisfatória, embora menor que nos *scaffolds* 58S, o que ocorre devido a presença do cálcio e do fósforo que aumentam a bioatividade dos *scaffolds* 58S. O aumento de temperatura de tratamento térmico ocasionou apenas pequena diminuição da atividade metabólica celular nos *scaffolds* 100S. Com base nesses resultados podemos concluir que os *scaffolds* 58S e 100S são biocompatíveis, uma vez que a viabilidade mínima aceitável como biocompatível é de 50% (MARTINS 2013).

Os resultados mostraram significado estatístico apenas dos *scaffolds* e do controle negativo em relação ao controle positivo, não houve diferença estatística significativa entre o controle negativo e os *scaffolds*, e entre os *scaffolds*, porém, observa-se que os *scaffolds* 58S e 100S, e com maior porcentagem o 58S, os *scaffolds* induziram a proliferação celular das células osteoblásticas primárias, fator de relevância para o sucesso da regeneração óssea e sua utilização na engenharia de tecido ósseo.

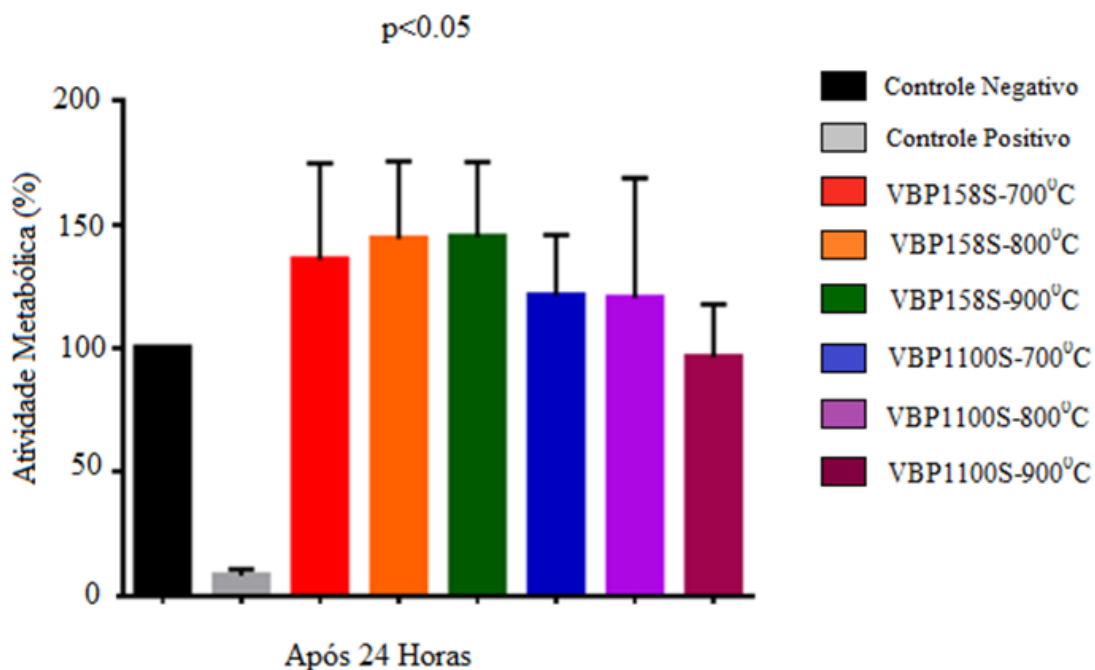


Figura 4.15- Atividade metabólica dos osteoblastos primários quando expostos aos materiais por 24 horas: - controle negativo, - controle positivo, - VBP158S-700°C, - VBP158S-800°C, - VBP158S-900°C, - VBP1100S-700°C, - VBP1100S-800°C e - VBP1100S-900°C.

Tabela 4.4- Porcentagem de atividade metabólica dos osteoblastos primários quando expostos aos materiais por 24 horas determinados pelo ensaio de MTT dos *scaffolds* de VB58S e VB100S com adição do agente porogênico parafina 1(P1).

AMOSTRA	ATIVIDADE METABÓLICA (%)
VBP158S-700⁰C	136
VBP158S-800⁰C	144
VBP158S-900⁰C	145
VBP1100S-700⁰C	121
VBP1100S-800⁰C	120
VBP1100S-900⁰C	97
Controle Positivo	8
Controle Negativo	100

4.3 CONCLUSÕES

A partir dos resultados conclui-se que os *scaffolds* obtidos via sol-gel do VB 58 e 100S com adição de parafina1 são viáveis para regeneração óssea. Apresentaram poros interconectados, com porcentagem de poros abertos superior a 50%, diâmetro de poros superior a 150 μ m.

Os VBPI58S-700⁰C, VBPI58S-800⁰C, VBPI58S-900⁰C, VBPI100S-700⁰C, VBPI100S-800⁰C e VBPI100S-900⁰C apresentaram diâmetro médio de poros: 269, 290, 278, 442, 400 e 371 μ m e porcentagem de macroporos abertos: 56,4%, 52%, 51%, 67,4%, 67,6% e 70%, respectivamente, sendo que a relação porosidade total/poros abertos foi de quase 100%.

Os *scaffolds* possuem formato de poros arredondados, abertos em seu interior, o que foi demonstrados através da caracterização tridimensional por MEV e μ CT. A estrutura de poros interconectados e superior a 150 μ m no interior do *scaffolds* favorece a migração celular, transporte de nutrientes, vascularização, crescimento tecidual e possível regeneração óssea.

Os *scaffolds* são mesoporosos na superfície (tamanho de poro entre 2-50nm), o tamanho dos mesoporos variaram de 9,4nm nos VBP1100S-900⁰C até 22,9nm nos VBP1100S-800⁰C. A SA variou de 73,2m²/g no VBP158S-800⁰C até 331,2m²/g nos VBP1100S-800⁰C.

Os *scaffolds* de VB 58S e 100S continuaram amorfos mesmo com o aumento de temperatura de tratamento térmico.

Os *scaffolds* não apresentaram citotoxicidade ao ensaio de MTT, induziram a proliferação das células osteoblásticas primárias, mesmo os *scaffolds* de VB100S, fator de relevância para o sucesso da regeneração óssea e sua utilização na engenharia de tecido ósseo.

CAPÍTULO 5

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÕES

O trabalho concluiu que é possível adicionar agentes porogênicos ao VB obtido via sol-gel e obter *scaffolds* viáveis para uso em regeneração óssea. Os *scaffolds* são mesoporosos em sua superfície e possuem SA até 331,2m²/g, com média de tamanho e porcentagem de poros satisfatórios. O único *scaffold* com quantidade de macroporos abertos inferior a 50% foi o VBC tratado a 900⁰C, que obteve 44% de porosidade.

A μ CT permitiu avaliar o tamanho e o número de poros no interior do *scaffold*, mostrando a distribuição e interconecção dos poros dos *scaffolds*.

O DRX dos *scaffolds* do VB 58S e 100S com adição de parafina1 e submetidos a tratamento térmico a 700, 800 e 900⁰C foi característico de materiais amorfos. Fator positivo para os *scaffolds*, pois a cristalinidade diminui a bioatividade do VB.

O ensaio de MTT mostrou que o material não possui citotoxicidade e induz a proliferação de células osteoblásticas primárias.

Os *scaffolds* desenvolvidos apresentam propriedades a serem exploradas que os tornam potenciais candidatos para uso como *scaffolds* para regeneração óssea.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Tratar os *scaffolds* de VB 58 e 100S com adição de parafina¹ a temperaturas superiores a 900⁰C e avaliar o efeito na cristalinidade do material.
- Ajustar os parâmetros da síntese do *scaffold* para evitar trincas e melhorar as propriedades mecânicas.
- Melhorar as propriedades mecânicas dos *scaffolds* e aumentar a porcentagem do agente porogênico no VB obtido via sol-gel.
- Testar outros agentes porogênicos.
- Avaliar a bioatividade dos *scaffolds* e comparar com a de outros biomateriais em meio compatível com as condições do meio biológico.
- Avaliar a taxa de degradação dos *scaffolds* em meio compatível com as condições em meio biológico.

CAPÍTULO 6

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. G. L. *Células Tronco Mesenquimais de Cães Associadas ou não à Vidro Bioativo, Diferenciação Osteogênica in vitro e Tratamento de Defeito Ósseo Crítico*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2013. 108p. (Tese, Doutorado em Ciência Animal).

AUM, Y. K. P. G. *Modelagem e Simulação da Deposição de Parafinas em Escoamento Turbulento*. Natal: Escola de Engenharia Química da UFRN, 2012. 79p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Química).

BAINO, F., FERRARIS, M., BRETCANU O., VERNÉ E., VITALE-BROVARONE, C. Optimization of Composition, Structure and Mechanical Strength of Bioactive 3D Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Substitution. *Journal of Biomaterials Applications*, v.27, p872s-890s, 2013.

BARRIONI, B. R. *Síntese e Caracterização de Filmes Biodegradáveis de Poliuretano Baseados em Hexametileno Diisocianato e Métodos de Tratamento para Aumento da Bioatividade*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2014. 107p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica, de Materiais e de Minas).

BELLUCCI, D., CANNILLO, V., SOLA, A. An Overview of The Effects of Thermal Processing on Bioactive Glasses. *Science of Sintering*, v.42, p307s-320s, 2010.

CHEN, Q., ROETHER, J., BOCCACCINI, A. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials. In: ASHAMMAKHI, N., editor; REIS, R., editor; CHIELLINI, F., editor. *Topics in Tissue Engineering*. Oulu, Finland: Expertissues e-books, 2008. V.4, c.6, p.1–27.

COELHO, M. B. *Desenvolvimento de Metodologia para Produção de Estruturas Tridimensionais Porosas de Vidro Bioativo para Aplicação em Engenharia de Tecidos*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2003. 146p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica).

CORBELLINI, M. P. *Estudo das Propriedades Biológicas e Mecânicas de Compósito com Matriz Polimérica de PMMA-EHA com Carga Vítrea*. Florianópolis: Escola de Engenharia da UFSC, 2006. 57p. (Monografia, Título de Engenheiro de Materiais).

CROVACE, M. C. *Obtenção de estruturas porosas altamente bioativas via sinterização do Biosilicato[®]*. São Carlos: Escola de Engenharia da UFSC, 2009. 141p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia de Materiais).

GERHARDT, L. C., BOCCACCINI, A. R. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*, v.3, p.3867s-3910s, jul. 2010.

GUIMARÃES, F. B. A. P. *Proteínas Morfogenéticas ósseas no processo de reparo e regeneração tecidual*. Belo Horizonte: Escola de Odontologia da UFMG, 2002. 71p. (Monografia, Especialização em Periodontia).

HELMINEN, A. O., KORHONEN, H., SEPPALA, J.V. Structure modification and crosslinking of methacrylated polylactide oligomers. *Journal of Applied Polymer Science*, v.86, p.3616s-3624s, dec. 2002.

HENCH, L. L. The story of Bioglass[®]. *J Mater Sci: Mater Med*, v.17, p967s-978s, 2006.

HENCH, L. L., ROKI, N., FENN, M .B. Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration. *Journal of Molecular Structure*. v.1073, p.24s-30s, sep. 2014.

IKEGAMI, R. A. *Desenvolvimento de corpos cerâmicos compostos bioativos com estrutura de gradiente funcional*. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2007. 110p. (Tese, Doutorado em Engenharia Mecânica).

JENSEN, S. S., BOSSHARDT, D. D.; BUSER, D. Enxertos ósseos e materiais substitutos ósseos. In: BUSER, D. *20 anos de regeneração óssea guiada em implantodontia*. 2.ed. São Paulo: Quintessence, 2010. Cap.4, p.71-96.

JIANG, G. L., WHITE, C. R., STEVENS, H.Y., FRANGOS, J.A. Temporal gradients in shear stimulate osteoblastic proliferation via ERK1/2 and retinoblastoma protein, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 283, p383s-389s, 2002.

JONES, J. Imperial Material: Materials Science and Engineering. Interview with professor Julian Jones. London, 2014. Disponível em: <<http://www3.imperial.ac.uk/imperialmaterial/materialsatimperial/jjones>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2014.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*. v.9, p4457s-4486s, 2013.

KANG, Y. *et al.* Creation of bony microenvironment with CaP and cell-derived ECM to enhance human bone-marrow MSC behavior and delivery of BMP-2. *Biomaterials*, v.32, n.26, p6119s-6130s, set. 2011.

LANG, N. P.; BECKER, W.; KARRING, T. Formação de osso alveolar. In: LINDHE, J., KARRING, T., LANG, N. P. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap.32, p.665-689.

LUIZ, F. F. M. *Caracterização físico-química e avaliação in vitro e in vivo de grânulos de hidroxiapatita e hidroxiapatita/beta-tricálcio fosfato*. Niterói: Faculdade de Medicina da UFF, 2013. 182p. (Tese, Doutorado em Ciências Médicas).

LYNCH, S. E., MARX, R. E., NEVINS, M., WISNER-LYNCH, L. A. *Tissue Engineering Applications in Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontics*. 2.ed. Chicago: Quintessence Publishing, 2008. 296p.

MA, J. *et al.* Influence of the sintering temperature on the structural feature and bioactivity of sol-gel derived SiO₂-CaO-P₂O₅ bioglass. *Ceramics International*, v.36, p1911s-1916s, 2010.

MACHADO, J. L. M. *et al.* Obtenção e utilização de microesferas de parafina para confecção de arcabouços teciduais baseados em cimento de α -fosfato tricálcico. *Cerâmica*, São Paulo, v.55, n.334, p216s-222s, Abr./Jun. 2009.

MANGANO, C. Laser e Implantes: Existe Sinergia? In: 6^o CONGRESSO DA ABLO E 2^o ENCONTRO DA DIVISÃO SUL AMERICANA DA WFLD. 2011, Belo Horizonte.

MARTINS, T. *Síntese e caracterização de hidrogéis de quitosana quimicamente reticulados para aplicação potencial no tratamento tópico de lesões cutâneas*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, 2013. 87p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia de Materiais).

MELCHELS, F. P. W., FEIJEN, J., GRIJPM, D. W. A poly(d,l-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Biomaterials*, v.30, p3801s-3809s, 2009.

MOREIRA, C. D. F. *Avaliação da adição de colágeno tipo I e nanopartículas de vidro bioativo a hidrogéis termossensíveis de quitosana para uso na engenharia de tecido*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2014. 75p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas).

OLIVEIRA, A. A. R. *Nova metodologia de obtenção de nanopartículas de vidro bioativo, poliuretanas biodegradáveis e seus compósitos para aplicações biomédicas*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2011. 196p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas).

OLIVEIRA, A. A. R. *Síntese e caracterização de espumas híbridas Vidro Bioativo/PVA para aplicação em engenharia de tecidos*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2007, 140p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas).

OWEN, S. C., SHOICHET M. S. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.94A, n.4, p1321s-1331s, sep, 2010.

PEREIRA, M. M., VASCONCELOS, W. L., ZAVAGLIA, C. A. C. Materiais Cerâmicos - Ciência e Aplicação como Biomateriais. In: ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. *Biomateriais; Fundamentos & Aplicações*. 1.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2012. Cap.3, p.61-81.

PEREIRA, M. M.; HENCH, L. L. Bioactive Glass. In: WNEK, G. E.; BOWLIN, G. L. (Eds.). *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2004. P.53–62.

PEREIRA, R. V. *Desenvolvimento de Scaffolds Biodegradáveis de PLDLA/Biovidro 58S Produzidos por Sinterização Seletiva a Laser*. Florianópolis: Escola de Engenharia da UFSC, 2013. 94p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Mecânica).

PINHEIRO, A. L. B. & GERBI, M. E. M. A Fotobiomodulação Laser Aplicada a Cirurgias Ósseas e a Implantodontia. In: PINHEIRO, A. L. B. *et al. Aplicação do Laser na Odontologia*. 1.ed. São Paulo: Santos Editora, 2010. Cap.17, p.351-379.

POOLGASUNDARAMPILLAI, G. *et al.* Cotton-wool-like bioactive glasses for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, v.10, p3733s–3746s, 2014.

RAHAMAN, M. N. *et al.* Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v.7, n.6, p2355s–2373s, jun. 2011.

RATNER, B. D. *et al. Biomaterials Science ; An Introduction to Materials in Medicine*. 2.ed. San Diego: Elsevier, 2004. 879p.

ROHR, T. G. *Estudo Reológico da Mistura Carboximetilcelulose/Amido e sua Utilização como Veículo de Inoculação Bacteriano*. Seropédica: Escola de Engenharia Química da UFRRJ, 2007. 98p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Química).

RONCA, A. *Bioactive Composite Scaffolds for Bone Regeneration :From the Process to the Biological Validation*. Napoli: Università Degli Studi di Napoli “Federico II”, 2010. 148p. (Tesi, Dottorato di Ricerca in Ingegneria Dei Materiali e Delle Strutture XXIII Ciclo).

RUTHVEN, D. M. *Principles of Adsorption and Adsorption Processes*. 1.ed. New York: John Wiley & Sons, 1984. 464p.

SANTOS, E. P. *et al.* Formation of Zirconia Foams Using the Thermostimulated Sol-Gel Transition. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v.304, p143s-150s, 2002.

SCARAMAL, J. P. S. *Incorporação de Porfirinas em Matrizes Sol-Gel: Preparação e Caracterização Espectroscópica*. Guarapuava: Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro-Pr, 2010. 68p. (Dissertação, Mestrado em Química).

SCHWARTZ, Z. *et al.* Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontology 2.000*, v.14, p158s-172s, 1997.

SING, K. S. W. *et al.* Reporting physisorption data for gas/solid systems. *Pure Appl Chem.*, v. 57, n.4, p603s-619s, 1985.

STUDART, A. R. *et al.* Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *J. Am. Ceram. Soc.*, v.89, n.6, p1771s-1789s, 2006.

YANG, S. *et al.* The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part 1. Traditional Factors. *Tissue engineering*, v.7, n.6, p679s-689s, 2001.

YOSHIKAWA, H.; TAMAI, N.; MURASE, T.; MYOUI, A. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J. R. Soc. Interface*, v.6, p341s-348s, 2009.