

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

Diogo Maia Moreira dos Santos

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE *SCAFFOLDS* COMPÓSITOS E
HÍBRIDOS DE VIDROS BIOATIVOS E POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) POR
TÉCNICAS AVANÇADAS DE FABRICAÇÃO**

Belo Horizonte

2024

Diogo Maia Moreira dos Santos

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE *SCAFFOLDS* COMPÓSITOS E
HÍBRIDOS DE VIDROS BIOATIVOS E POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) POR
TÉCNICAS AVANÇADAS DE FABRICAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes

Belo Horizonte

2024

S237d

Santos, Diogo Maia Moreira dos.

Desenvolvimento e avaliação de *scaffolds* compósitos e híbridos de vidros bioativos e poli(álcool vinílico) por técnicas avançadas de fabricação [recurso eletrônico] / Diogo Maia Moreira dos Santos. – 2024.

1 recurso online (165 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Eduardo Henrique Martins Nunes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 137-165.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses.
3. Engenharia de tecidos - Teses. 4. Vidros bioativos - Teses.
5. Biomateriais - Teses. 5. Impressão 3D - Teses. I. Nunes,
Eduardo Henrique Martins. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 620(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ENGENHARIA - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA MATERIAIS E DE MINAS - SECRETARIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO/TESE

Às 13:30 do dia 18 (dezoito) de outubro de 2024, na sala 2240 Bloco II do Prédio da Escola de Engenharia, realizou-se a sessão pública da defesa de tese de Doutorado do(a) aluno(a) **DIOGO MAIA MOREIRA DOS SANTOS**, para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, na área de concentração de Ciência e Engenharia de Materiais. O presidente da sessão, Prof. Eduardo Henrique Martins Nunes, orientador aluno(a), apresentou a comissão examinadora, composta pelos seguintes membros: Manuel Houmard - Dr. (UFMG), Breno Rocha Barrioni - Dr. (UFLA), Daniel Cristian Ferreira Soares - Dr. (UNIFEI), Marcello Rosa Dumont - Dr. (CEFET/MG) e Eduardo Henrique Martins Nunes (Orientador) - Dr. (UFMG). Na sequência, o(a) candidato(a) realizou a apresentação de sua Tese de Doutorado, intitulada "**Desenvolvimento e Avaliação de Scaffolds Compósitos e Híbridos de Vidros Bioativos e Álcool Polivinílico por Técnicas Avançadas de Fabricação**". Após a apresentação, os examinadores procederam à arguição do(a) candidato(a). Concluída essa etapa, a comissão reuniu-se em caráter reservado, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, e decidiu por **APROVAR** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo presidente da sessão. Não havendo mais nada a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata, que, após lida, foi assinada pelos membros da comissão examinadora e pelo coordenador do Programa.

Belo Horizonte, 18 de outubro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Cristian Ferreira Soares, Usuário Externo**, em 21/10/2024, às 07:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcello Rosa Dumont, Usuário Externo**, em 21/10/2024, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Breno Rocha Barrioni, Usuário Externo**, em 21/10/2024, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Manuel Noel Paul Georges Houmard, Professor(a)**, em 21/10/2024, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Henrique Martins Nunes, Professor do Magistério Superior**, em 22/10/2024, às 09:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Majuste, Professor do Magistério Superior**, em 17/01/2025, às 09:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3646016** e o código CRC **1E3064F3**.

Dedico este trabalho não apenas a todos que me acompanharam ao longo desta jornada, mas também a cada estudante que viu seus sonhos acadêmicos interrompidos, àqueles que nem imaginam que essa possibilidade existe, e aos que acreditam ser impossível alcançá-la.

AGRADECIMENTOS

No fim desta importante etapa, reafirmo um pensamento que tive durante o mestrado: nada disso seria possível sem a ajuda de todos ao meu redor. Concluo o doutorado com muitas colaborações que vão além de um projeto de pesquisa, e sou imensamente grato às seguintes pessoas:

Primeiramente, agradeço ao Eduardo, que antes mesmo de ser o Prof. Dr. Eduardo Nunes, foi um grande amigo, sempre presente nos momentos mais difíceis, nunca me deixando faltar suporte e compreensão. Enquanto muitos mencionam a relação desafiadora com seus orientadores, nunca pude (graças a Deus) dizer o mesmo. Eduardo é um exemplo de pessoa, amigo e profissional, e muitos que estão mencionados aqui são testemunhas disso. Passamos por sufocos, longas horas de trabalho, processos e ensaios repetidos, mas também por muitas risadas, celebrações e alegrias; serei eternamente grato por tudo. Agradeço também à Patrícia, pois, se não fosse por ela nos salvando em tantos momentos a mim e ao PPGEM, eu não teria chegado até aqui.

A Dra. Marivalda também foi extremamente importante no início da minha pós-graduação e continuou a ser até o final do doutorado. Sem seus valiosos conselhos e imensa sabedoria, eu sequer teria começado. Em meu nome e em nome do novo curso de Engenharia de Materiais que você criou, meus sinceros agradecimentos e parabéns.

Agradeço ao Prof. Manuel Houmard pelos ensinamentos, conselhos, avaliações de resultados e piadas infames; ao Prof. Daniel Cristian por me acompanhar desde antes da qualificação e ser de imensurável ajuda nos ensaios biológicos. A Dra. Agda, que me acompanha desde a graduação, também expressei meu agradecimento.

Agradeço aos outros professores e funcionários do Departamento de Engenharia Metalúrgica, Materiais e Minas, em especial à Maria Aparecida Pacheco, Diego, Kelly, Ilda, Patrícia, Samuel, Andréia, Fernando e Leonardo.

Aos companheiros e amigos do PPGEM, que incontáveis vezes me socorreram em experimentos, testes, soluções improvisadas e recursos. Companheiros de diversos laboratórios, como o Felipe, Matheus, Paula, Jorgimara, Daísa e Luciana, assim como o pessoal do Lab Bio:

Talita, Breno, Alice, Amanda, Andréia, Cheisy, Hugo, Ingrid, Layla, Mariana, Marina, Miguel, Priscilla, Sandhra e Samuel. Sem a leveza e ensinamentos de vocês, a vida no laboratório não seria a mesma. Um agradecimento especial a Gustavo Luiz, que participou de várias etapas deste trabalho.

Aos amigos de longa jornada, que se tornaram a família que escolhi, meu amor eterno a vocês, que me inspiram todos os dias, na alegria e na tristeza: César, Felipe, João, Luquinhas, Mateus, Thiago e Victor. Aos amigos que a vida inesperadamente colocou na mesma mesa de RPG, sou fã incondicional de vocês: Valéria, Lipe & Iago. Muito obrigado aos 'Quarentenes': Anjo, Ricardo, Misa, Joás e Samuel, por tudo que compartilhamos, nos momentos difíceis e nas vitórias. Em especial, Ricardinho e Mônica, pelas grandes ajudas ao longo do doutorado. Agradeço à Iracema, Ludmila e Rodrigo pela companhia desde a graduação; Andrey, Rafael, Victor e Nando, por todas as mensagens de suporte, mesmo à distância.

Expresso minha profunda gratidão ao meu namorado, Igor Pablo, carinhosamente chamado de 'BB', por estar ao meu lado durante grande parte dessa jornada de doutorado, tanto no Brasil quanto no exterior. Agradeço por todo o apoio, seja ele direto ou indireto, pelo amor, pelas risadas, e por me ajudar nos momentos em que pensei que o cansaço me venceria.

À minha família, por me trazer até aqui, apoiar minhas escolhas difíceis e me aturar durante todos esses anos. Agradeço aos meus pais, Anísio e Marli, meu irmão, minha cunhada Amanda e minha tia mais querida, Madila. Nunca me esquecerei de vocês: vó Edna, vô Gabis, tio Zézé e Marinho, in memoriam.

I am deeply grateful to Professor Julian R. Jones for accepting me as part of his research group, for his guidance and knowledge, and for teaching me so much in such a brief time during my sandwich PhD. To Imperial College and its staff, for their support throughout my stay. To the JRJ group, for the opportunity to collaborate, learn, and share my experiences. My sincere thanks, especially to Fra, Agathe, Hafsa, Meryem, Susi, and Loyd.

Finalmente, agradeço ao CNPq, CAPES e ao programa CAPES PrInt pelo apoio financeiro.

"Viver é partir, voltar e repartir."
(Emicida e Gilberto Gil, É Tudo Pra Ontem)

RESUMO

A engenharia de tecidos ósseos é uma área de pesquisa promissora, com grande potencial para substituir ou reparar defeitos ósseos, oferecendo alternativas mais eficazes e econômicas em relação aos métodos tradicionais de enxerto. O uso de *scaffolds* bioativos na regeneração óssea não só melhora os resultados clínicos, mas também pode reduzir os custos hospitalares associados a procedimentos mais invasivos. Esse estudo apresenta o desenvolvimento e a caracterização de *scaffolds* compósitos à base dos vidros bioativos 58S (% m/m 58:33:9 de SiO₂:CaO:P₂O₅) e 13-93 (% m/m 53:20:12:6:5:4 de SiO₂:CaO:K₂O:Na₂O:MgO:P₂O₅) variando entre composições de 30/70, 50/50 e 70/30 em porcentagem de massa entre os sólidos e de *scaffolds* de vidro bioativo 58S e o polímero biodegradável poli(álcool vinílico) (PVA) em porcentagens 95/05, 90/10 e 80/20, produzidos pelo processo de *freeze-casting*. Híbridos de vidro 58S e PVA de proporção 50/50 foram produzidos por impressão 3D. Os materiais obtidos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de dispersão de energia por raios X, microtomografia de raios X, ensaios de porosidade e testes mecânicos de compressão uniaxial. A bioatividade foi analisada por imersão em solução fisiológica simulada, enquanto a citotoxicidade foi avaliada por citometria de fluxo e microscopia óptica. As propriedades mecânicas variaram de acordo com a proporção das fases. Nos *scaffolds* de 58S/13-93, um maior teor de 13-93 resultou em maior resistência mecânica e módulo de Young com valores de $11,25 \pm 2,48$ Mpa e $0,81 \pm 0,27$ GPa, respectivamente. Já nos *scaffolds* cerâmico-poliméricos, o aumento da fração polimérica culminou em um módulo de tenacidade de $154,0 \pm 15,8 \times 10^6$ J.m⁻³, devido ao efeito de aglomeração das partículas provocadas pelo do PVA. Os *scaffolds* produzidos por *freeze-casting* e impressão 3D apresentaram porosidade adequada para aplicações em engenharia de tecidos, com valores superiores a 60 %. Além disso, todos os materiais demonstraram elevada bioatividade, com a formação de hidroxiapatita após 24 horas de imersão em fluido corpóreo simulado. Os testes de citotoxicidade confirmaram viabilidade celular superior a 80 %, indicando a biocompatibilidade dos materiais. Este trabalho demonstra que a proporção entre os vidros bioativos 58S e 13-93 e o polímero PVA pode ser ajustada para otimizar as propriedades mecânicas, a bioatividade e a estrutura porosa dos *scaffolds*, oferecendo soluções promissoras para a regeneração óssea.

Palavras-chave: engenharia de tecidos; *scaffolds* bioativos; vidros bioativos; poli(álcool vinílico); *freeze-casting*; impressão 3D.

ABSTRACT

Bone tissue engineering is a promising research field with significant potential to replace or repair bone defects, offering more effective and cost-efficient alternatives to traditional grafting methods. The use of bioactive scaffolds in bone regeneration not only improves clinical outcomes but also reduces hospital costs associated with more invasive procedures. This study presents the development and characterization of composite scaffolds based on the bioactive glasses 58S (wt.% 58:33:9 of SiO₂:CaO:P₂O₅) and 13-93 (wt.% 53:20:12:6:5:4 of SiO₂:CaO:K₂O:Na₂O:MgO:P₂O₅) in compositions of 30/70, 50/50, and 70/30 by weight fraction between solids, as well as scaffolds of bioactive glass 58S and the biodegradable polymer polyvinyl alcohol (PVA) at percentages of 95/05, 90/10, and 80/20, produced via the *freeze-casting* process. Hybrids of 58S glass and PVA with a 50/50 ratio were produced by 3D printing. The obtained materials were characterized using scanning electron microscopy, energy-dispersive X-ray spectroscopy, X-ray microtomography, porosity analysis, and uniaxial compression mechanical tests. Bioactivity was analysed through immersion in simulated physiological solution, while cytotoxicity was assessed via flow cytometry and optical microscopy. The mechanical properties varied according to the phase ratio. For the 58S/13-93 scaffolds, a higher 13-93 content resulted in greater mechanical strength and Young's modulus, with values of 11.25 ± 2.48 MPa and 0.81 ± 0.27 GPa, respectively. In ceramic-polymer scaffolds, increasing the polymer fraction resulted in a toughness modulus of $154.0 \pm 15.8 \times 10^6$ J·m⁻³, attributed to particle agglomeration effects induced by the PVA. The scaffolds produced by *freeze-casting* and 3D printing showed porosity suitable for tissue engineering applications, with values exceeding 60%. Additionally, all materials exhibited high bioactivity, with hydroxyapatite formation observed after 24 hours of immersion in simulated body fluid. Cytotoxicity tests confirmed cell viability above 80%, indicating the biocompatibility of the materials. This work demonstrates that the proportion of bioactive glasses 58S and 13-93 and the polymer PVA can be adjusted to optimize the mechanical properties, bioactivity, and porous structure of the scaffolds, offering promising solutions for bone regeneration.

Keywords: tissue engineering; bioactive scaffolds; bioactive glasses; polyvinyl alcohol; *freeze-casting*; 3D printing.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 - Fluxograma das etapas na produção de <i>scaffolds</i> deste trabalho..... | 24 |
| Figura 3.1 - Composição de biotinta incluindo a matriz extracelular (orgânica/inorgânica) e biológica. | 30 |
| Figura 3.2 - Organização das estruturas orgânicas e inorgânicas presentes no osso de escala macro para a nano..... | 32 |
| Figura 3.3 – Difratoograma de amostras de VB 58S sinterizado á 1250 °C e não siterizado evidenciando a formação de fases cristalinas. | 36 |
| Figura 3.4 - Processo de formação diferentes produtos pelo método sol-gel..... | 39 |
| Figura 3.5 - Rede bidimensional com átomos formadores e modificadores de rede..... | 39 |
| Figura 3.6 – Reações de um vidro com cálcio em fluido corporal. | 41 |
| Figura 3.7 - Corte histológico em MEV de implante de vidro bioativo em osso. Em (a) corte de um implante de VB (porção mais clara e central) em tecido ósseo. Em (b) a região destacada pelo círculo branco está ampliada | 42 |
| Figura 3.8 - Monômero do PVA com hidroxila | 46 |
| Figura 3.9 - Acetato de vinilia (à esquerda) utilizado para a síntese do PVAc (monômero) à direita. | 46 |
| Figura 3.10 - Ataque à insaturação do acetato de vinila e inicio da polimerização | 46 |
| Figura 3.11 - Etapa de propagação | 47 |
| Figura 3.12 - Reação de combinação (acima) e desproporcionamento (abaixo)..... | 47 |
| Figura 3.13 - Comportamento das fases amorfas e cristalina de um polímero semi-cristalino durante a tração..... | 49 |
| Figura 3.14 - Modelos representativos de compósitos com tipos e orientações de reforços em relação à matriz..... | 52 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.15 - Esquema das etapas envolvidas no processo <i>freeze-casting</i> . (a) Preparação da massa cerâmica; (b) Solidificação do solvente; (c) Sublimação; (d) Sinterização..... | 57 |
| Figura 3.16 - Microscopia de <i>scaffold</i> de VB/água resfriado com nitrogênio líquido com estruturas de poros lamelares..... | 58 |
| Figura 3.17 – Micrografias típicas de amostras preparadas via processo <i>freeze-casting</i> . Em (a) alumina porosa com solvente de naftaleno-cânfora hipereutética, (b) alumina com água como solvente, (c) carbetto de silício e policarbossilano e em (d) alumina com canfeno..... | 58 |
| Figura 3.18 - Efeito da taxa de resfriamento sobre a estrutura de poros de material obtido por processo <i>freeze-casting</i> . (a), (b) e (c) se referem, respectivamente, a baixa, moderada e elevada taxas de resfriamento | 59 |
| Figura 4.1 – Rota de síntese sol gel do vidro bioativo 58S..... | 65 |
| Figura 4.2 – Rota de síntese do vidro bioativo 13-93..... | 66 |
| Figura 4.3 – Processo de produção de <i>scaffolds</i> cerâmicos de vidros bioativos 58S/13-93 por <i>freeze-casting</i> | 67 |
| Figura 4.4 – Vidro bioativo antes (esquerda) e depois (à direita) da secagem..... | 71 |
| Figura 4.5 – MEV de partículas de vidro bioativo 58S (acima) e 13-93 (abaixo) produzidas por sol-gel. | 72 |
| Figura 4.6 – Isotermas de adsorção de N ₂ dos vidros 58S e 13-93 tratados termicamente. | 73 |
| Figura 4.7 – Padrões de DRX dos vidros 58S e 13-93 tratados termicamente..... | 74 |
| Figura 4.8 - Bandas de absorção em FTIR dos vidros 58S e 13-93 | 75 |
| Figura 4.9 - <i>Scaffolds</i> cerâmicos produzidos antes (acima) e depois (abaixo) da sinterização, evidenciando manutenção da forma e discreta redução de dimensões..... | 75 |
| Figura 4.10 – Micrografias de MEV de <i>scaffolds</i> por <i>freeze-casting</i> (a) antes e (b) depois da sinterização nas proporções 30/70, 50/50 e 70/30 da esquerda para a direita. Setas brancas indicam a direção dos poros antes do tratamento. | 76 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4.11 – Contração volumétrica observada durante a sinterização (a) e porosidade medida por testes de Arquimedes (b)..... | 78 |
| Figura 4.12 - Imagens de micro-CT mostrando a morfologia típica de uma estrutura sinterizada em (a), e distribuições de tamanho de poros determinadas por análise de micro-CT em (b)... | 79 |
| Figura 4.13 - Resistência à compressão e Módulo de Elasticidade..... | 80 |
| Figura 4.14 - Padrões de DRX (a) e espectros de FTIR (b) obtidos para amostras imersas em SBF por até 14 dias..... | 82 |
| Figura 4.15 - Micrografias de MEV (à esquerda) e seus respectivos espectros de EDS (à direita) obtidos para <i>scaffolds</i> imersos em SBF por 3 dias. | 84 |
| Figura 4.16 - Painéis de citometria de fluxo obtidos neste estudo para grupos controle. | 85 |
| Figura 4.17 - Painéis de citometria de fluxo obtidos neste estudo para cultivo de MRC-5 em extratos dos <i>scaffolds</i> produzidos. | 86 |
| Figura 4.18 - Fotomicrografia de células MRC-5 cultivadas em extratos de <i>scaffolds</i> compósitos. *Célula saudável fusiforme **Célula arredondada aderida ao substrato ***Célula arredondada despreendida. | 88 |
| Figura 5.1 - Esquema da metodologia utilizada para preparar os <i>scaffolds</i> compósitos de 58S/PVA congelados por colagem. | 93 |
| Figura 5.2 - (a) Padrão de DRX, (b) espectro de FTIR do vidro bioativo 58S. | 97 |
| Figura 5.3 - (a) Isoterma de adsorção de N ₂ , (b) distribuição do tamanho de partículas | 98 |
| Figura 5.4 - Micrografias de MEV de <i>scaffolds</i> porosos, mostrando diferentes composições de 58S e PVA e reconstrução por Micro-CT de <i>scaffold</i> de proporção 90/10..... | 99 |
| Figura 5.5 –Avaliação da porosidade por Arquimedes dos <i>scaffolds</i> compósitos de 58S/PVA preparados em diferentes razões de carga (a) e distribuição do diâmetro dos poros medida por micro-CT (b)..... | 101 |
| Figura 5.6 - (a) Curvas obtidas a partir de testes de compressão, (b) valores de resistência à compressão, módulo de Young e tenacidade calculados a partir dessas curvas..... | 102 |

| | |
|---|-----|
| Figura 5.7 - (a) Análises de DRX e (b) FTIR realizadas em <i>scaffolds</i> compósitos imersos em SBF por até 14 dias..... | 104 |
| Figura 5.8 - Micrografias de MEV realizadas em <i>scaffolds</i> antes de imersão em SBF (esquerda) e mantidos em SBF por 7 dias (direita). | 105 |
| Figura 5.9 – Espectros de EDS de <i>scaffolds</i> imersos em SBF por 7 dias..... | 107 |
| Figura 5.10 – Painéis de citometria de fluxo de células MRC-5 em cultivo com extrato de <i>scaffolds</i> | 109 |
| Figura 5.11 - Ensaio de microscopia óptica realizados em células MRC-5 cultivadas em extratos de <i>scaffolds</i> compósitos. | 110 |
| Figura 6.1 – Modelo 3D tipo caixa com preenchimento em grade utilizado na impressão dos <i>scaffolds</i> e peça pronta à direita..... | 115 |
| Figura 6.2 – Metodologia empregada na produção de <i>scaffolds</i> híbridos com CME por impressão 3D. | 116 |
| Figura 6.3 – Micrografias por MEV de <i>scaffolds</i> híbridos em diversos aumentos indicando a trama utilizada e a uniformidade da superfície sem fases distinguíveis em escala micrométrica. | 119 |
| Figura 6.4 – Modelo 3D construído por Micro-CT à esquerda e distribuição de espaçamento da trama à direita. | 120 |
| Figura 6.5 – Espectros de FTIR de vidro SiO ₂ , de PVA e do Híbrido desses dois componentes com proporção 50/50 m/m %. | 121 |
| Figura 6.6 – Espectro de FTIR do híbrido com proporção 50/50 m/m % entre fases inorgânica de vidro 58S e orgânica de PVA | 122 |
| Figura 6.7 – Deconvolução da região entre 900 e 1200 cm ⁻¹ do FTIR do <i>scaffold</i> híbrido ... | 123 |
| Figura 6.8 – EDS da superfície do <i>scaffold</i> recoberta por ouro, evidenciando a presença de cálcio e fósforo na composição. | 124 |

| | |
|--|-----|
| Figura 6.9 – Padrões de DRX de <i>scaffolds</i> híbridos em SBF à esquerda e espectros do mesmo material à direita evidenciando a presença de hidroxiapatita a partir das primeiras 24 em ambas análises | 125 |
| Figura 6.10 – Painéis de citometria de fluxo do controle negativo e de <i>scaffolds</i> híbridos ... | 126 |
| Figura 6.11 – Microscopia óptica de culturas em extratos do material híbrido apresentando alta confluência e morfologia característica da linhagem | 127 |
| Figura 7.1 – Morfologia de poros evidenciando o resultado direto do congelamento ou processo de impressão. | 132 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 3.1 - Reforço de propriedades em relação à variação da massa molar e grau de hidrólise | 48 |
| Tabela 4.1 – Porosidade aberta, fechada e total dos <i>scaffolds</i> mensuradas por testes de Arquimedes. Significância: ns = não significativo, $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) e conforme determinado por método One-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey. | 78 |
| Tabela 4.2 - Resistência à compressão e Módulo de Young dos <i>scaffolds</i> produzidos. | 79 |
| Tabela 4.3 - Valores do espectro EDS da superfície geral do <i>scaffold</i> e da estrutura de HA, com a razão molar Ca/P..... | 83 |
| Tabela 4.4 – Viabilidade celular de células MRC-5 para cada um dos <i>scaffolds</i> compósitos preparados avaliada por citometria de fluxo..... | 87 |
| Tabela 5.1 – Porosidade fechada, aberta e total dos <i>scaffolds</i> medida por Arquimedes. | 101 |
| Tabela 5.2 – Resistência à compressão, Módulo de young e módulo de Tenacidade de <i>scaffolds</i> produzidos. | 102 |
| Tabela 5.3 – Valores do espectro EDS da superfície geral do <i>scaffold</i> e da estrutura de HA, com a razão molar Ca/P..... | 106 |
| Tabela 5.4 - Proporções médias de células vivas, mortas e viáveis em cada <i>scaffold</i> compósito preparado, conforme determinado por citometria de fluxo. | 108 |
| Tabela 6.1 – Viabilidade celular em contato com extrato híbrido..... | 126 |
| Tabela 7.1 – Comparação entre fases do material e propriedades mecânicas. | 129 |
| Tabela 7.2 – Valores de resistência mecânica de <i>scaffolds</i> compósitos de vidro bioativo e polímeros processados por <i>freeze-casting</i> e impressão 3D. | 130 |
| Tabela 7.3 – Porosidades das rotas trabalhadas e diâmetro médio de poros. | 131 |
| Tabela 7.4 - Tempo de formação da camada de HA para os <i>scaffolds</i> desenvolvidos neste trabalho. | 132 |
| Tabela 7.5 – Viabilidade celular de meios de cultivos em contato com extratos dos materiais examinados. | 133 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| ABS | Acrilonitrila Butadieno Estireno |
| AC | Ácido Cítrico |
| CME | Metoxietóxido de Cálcio |
| DMEM | Meio de eagle modificado de Dubblecco, do inglês <i>Dulbecco modified eagle médium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DRX | Difração de Raios-X |
| EDS | Espectroscopia de Energia Dispersiva |
| FDM | Modelo por Deposição Fundida, do inglês <i>Fused Deposition Modeling</i> |
| FSC | Dispersão frontal, do inglês <i>Forward Scatter</i> |
| FTIR | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier |
| HAp | Hidroxiapatita |
| ICP-EOS | Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| Micro-CT | Microtomografia de raio-X |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| PGA | Poli(ácido glicólico) |
| PLA | Poli(ácido láctico) |
| PVA | Poli(álcool vinílico) |
| PVAc | Poli(acetato de vinila) |
| SBF | Fluido corporal simulado, do inglês <i>Simulated Body Fluid</i> |
| SLA | Estereolitografia |
| SLS | Sinterização Seletiva a Laser, do inglês <i>Selective Laser Sintering</i> |
| SSC | Dispersão lateral, do inglês <i>Side Scatter</i> |
| TEOS | Tetraetilortosilicato |
| TEP | Fosfato de Trietila |
| VB | Vidro Bioativo |
| 7-AAD | 7-Aminoactinomicina D |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 20 |
| 2. OBJETIVO | 25 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 25 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 25 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 27 |
| 3.1. ENGENHARIA DE TECIDOS | 27 |
| 3.1.1. Histórico e evolução | 27 |
| 3.1.2. Tecido Ósseo | 31 |
| 3.2. VIDRO BIOATIVO | 34 |
| 3.2.1. Métodos de Produção | 37 |
| 3.2.2. Bioatividade | 40 |
| 3.2.3. Vidro Bioativo 58S | 42 |
| 3.2.4. Vidro Bioativo 13-93 | 43 |
| 3.3. POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) | 44 |
| 3.3.1. Síntese de PVA | 46 |
| 3.3.1. Propriedades mecânicas e químicas | 48 |
| 3.3.2. Biocompatibilidade | 50 |
| 3.4. COMPÓSITOS | 50 |
| 3.5. MATERIAIS HÍBRIDOS | 53 |
| 3.6. PROCESSOS DE FABRICAÇÃO | 55 |
| 3.6.1. <i>Freeze-casting</i> | 56 |
| 3.6.2. Manufatura aditiva | 60 |
| 4. FREEZE-CASTING DE COMPÓSITOS CERÂMICOS | 63 |
| 4.1. INTRODUÇÃO | 63 |
| 4.2. MATERIAIS E MÉTODOS | 64 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.1. Reagentes..... | 64 |
| 4.2.2. Processo Sol-Gel - Vidro Bioativo 58S..... | 64 |
| 4.2.3. Processo Sol-Gel - Vidro Bioativo 13-93..... | 65 |
| 4.2.4. Preparação de matrizes porosas via técnica <i>Freeze-casting</i> | 66 |
| 4.2.5. Caracterização estrutural | 67 |
| 4.2.6. Bioatividade..... | 69 |
| 4.2.7. Biocompatibilidade..... | 69 |
| 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 71 |
| 4.3.1. Vidros Bioativos | 71 |
| 4.3.2. Propriedades estruturais e mecânicas de <i>scaffolds</i> | 75 |
| 4.3.3. Bioatividade..... | 81 |
| 4.3.4. Biocompatibilidade..... | 84 |
| 4.4. CONCLUSÃO PARCIAL..... | 89 |
| 5. FREEZE-CASTING DE COMPÓSITOS CERÂMICOS-POLIMÉRICOS..... | 91 |
| 5.1. INTRODUÇÃO..... | 91 |
| 5.2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 92 |
| 5.2.1. Reagentes..... | 92 |
| 5.2.2. Síntese sol-gel do Vidro 58S | 92 |
| 5.2.3. <i>Freeze-casting</i> | 93 |
| 5.2.4. Caracterização Estrutural..... | 94 |
| 5.2.5. Bioatividade..... | 95 |
| 5.2.6. Viabilidade Celular..... | 95 |
| 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 97 |
| 5.3.1. Vidro Bioativo | 97 |
| 5.3.2. Análise estrutural e mecânica de <i>scaffolds</i> | 98 |
| 5.3.3. Bioatividade..... | 103 |
| 5.3.4. Viabilidade celular..... | 107 |

| | |
|---|------------|
| 5.4. CONCLUSÃO PARCIAL..... | 111 |
| 6. MANUFATURA ADITIVA DE HÍBRIDOS | 113 |
| 6.1. INTRODUÇÃO..... | 113 |
| 6.2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 114 |
| 6.2.1. Reagentes..... | 114 |
| 6.2.2. Preparação de Metoxietóxido de Cálcio (CME)..... | 114 |
| 6.2.3. Síntese do híbrido | 114 |
| 6.2.4. Impressão 3D..... | 115 |
| 6.2.5. Caracterização Estrutural..... | 116 |
| 6.2.6. Bioatividade..... | 117 |
| 6.2.7. Viabilidade celular..... | 117 |
| 6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 118 |
| 6.3.1. Caracterização estrutural | 118 |
| 6.3.2. Bioatividade..... | 124 |
| 6.3.3. Viabilidade celular..... | 125 |
| 6.4. CONCLUSÃO..... | 127 |
| 7. CONCLUSÕES FINAIS | 129 |
| 7.1. COMPARAÇÃO ENTRE AS ROTAS..... | 129 |
| 7.1.1. Propriedades Mecânicas | 129 |
| 7.1.2. Morfologia de Poros | 130 |
| 7.1.3. Bioatividade..... | 132 |
| 7.1.4. Viabilidade Celular..... | 133 |
| 7.2. CONCLUSÕES GERAIS | 134 |
| 7.3. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 135 |
| 7.4. CONTRIBUIÇÕES PARA LITERATURA | 136 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 137 |

1. INTRODUÇÃO

O avanço da medicina e a melhoria da qualidade de vida têm contribuído para o aumento da longevidade da população. Em 2024, a expectativa de vida média no Brasil é de 77,6 anos, com previsão de alcançar 80,6 anos em 2050, segundo dados do IBGE [1]. Esse aumento tem impactos econômicos, sociais, ambientais e no organismo, que perde suas capacidades com o passar dos anos. A estrutura óssea, por exemplo, deteriora devido à sua desmineralização e ao aumento da porosidade dos ossos. Esse cenário resulta em problemas como fraturas por impactos, inflamações e lesões associadas a práticas de trabalho não ergonômicas e ao sedentarismo crescente do século XXI, que podem se tornar crônicos e difíceis de tratar, tornando essencial a utilização de intervenções médicas, próteses e implantes para reparar regiões danificadas [2]. Estima-se que mais de 2 milhões de procedimentos de enxerto ósseo sejam realizados mundialmente a cada ano [3–5]. Embora os enxertos autólogos sejam frequentemente considerados a melhor opção devido à ausência de requisitos de processamento, sua aplicação é limitada por restrições no tamanho e forma do enxerto e por complicações relacionadas à morbidade no local doador [6]. Como resultado, a demanda por biomateriais tem aumentado na medicina regenerativa nas últimas décadas [7].

Um biomaterial é definido como uma substância ou mistura projetada para controlar o curso de um procedimento terapêutico tratar para reparar, substituir ou melhorar funções de tecidos e órgãos do corpo ou também corrobora para um diagnóstico por meio da interação com um sistema biológico [8]. O mercado global de biomateriais foi de US\$ 152,58 bilhões em 2023 e deve alcançar US\$ 171,75 bilhões no ano de 2024 [9]. Em resposta a essa demanda, governos e universidades ao redor do mundo têm intensificado esforços e investimentos no desenvolvimento de biomateriais inovadores para aprimorar suas aplicações na medicina regenerativa.

O aumento dessa demanda evidencia a necessidade de biomateriais que conciliem propriedades biológicas e mecânicas para aplicações específicas. Vidros bioativos e vitrocerâmicas destacam-se nesse cenário como materiais estratégicos na medicina regenerativa. Os vidros bioativos (VB) e as vitrocerâmicas desempenham um papel relevante nas aplicações biomédicas, especialmente na regeneração óssea e em implantes

dentários. Esses materiais são reconhecidos por sua capacidade de interagir de maneira controlada com tecidos biológicos, promovendo a integração entre o implante e o osso, um processo conhecido como osteointegração [10,11]. Enquanto os VB são preferidos para situações que exigem uma rápida osteointegração e alta bioatividade, as vitrocerâmicas oferecem uma solução mais robusta em termos mecânicos para aplicações que requerem maior suporte estrutural e menor bioatividade. A redução da bioatividade e o aumento da resistência ocorrem principalmente devido à cristalização do material durante o processo de sinterização. Entre as diversas composições dos VB, aqueles com maiores teores de sílica são mais resistentes à cristalização, e a introdução de óxidos pode melhorar a trabalhabilidade desses materiais, com uma diminuição discreta de sua bioatividade [12,13]. A associação entre vidros bioativos e polímeros sintéticos, como o PVA, tem demonstrado grande potencial na superação das limitações individuais desses materiais. Essa abordagem possibilita a criação de compósitos com propriedades ajustáveis e otimizadas para aplicações biomédicas.

Os polímeros oferecem uma combinação única de versatilidade, biocompatibilidade e processabilidade, tornando-os ideais para uma ampla gama de aplicações biomédicas. No entanto, como qualquer classe de materiais, eles têm suas limitações, incluindo desafios na bioatividade, controle de degradação e resistência mecânica [14]. O PVA é um polímero sintético amplamente utilizado em aplicações biomédicas. Ele pode ser utilizado como ligante em suspensões cerâmicas pela sua facilidade de solubilização em água e eficiente agregamento de partículas pelas suas moléculas. Além disso, sua característica semicristalina e disponibilidade em diversos graus de hidrólise propiciam um controle sobre as propriedades mecânicas em processos de fabricação de compósitos [10]. O desenvolvimento contínuo de novos polímeros e compósitos promete superar muitas dessas desvantagens, expandindo ainda mais o uso de polímeros na medicina.

Apesar dos compósitos combinarem qualidades importantes de cada componente em um só dispositivo, a criação de estruturas que combinem bioatividade, resistência mecânica e porosidade controlada continua a ser um desafio. Muitos biomateriais utilizados em implantes necessitam de uma arquitetura porosa adequada para permitir a integração com o tecido biológico, facilitando a vascularização e o crescimento celular. A porosidade desempenha um papel crucial, pois influencia diretamente a taxa de proliferação celular e o transporte de nutrientes, além de afetar as propriedades mecânicas do material.

Técnicas de processamento como o *freeze-casting* e a impressão 3D se destacam por permitir o controle preciso dessa porosidade, garantindo propriedades essenciais ao *scaffold* de forma complementar aos materiais empregados [15]. No estado da arte, a manufatura aditiva de estruturas tridimensionais com detalhes avançados de biomimetismo em aspectos morfológicos, mecânicos, químicos e biológicos é altamente promissora. As tecnologias de impressão de células permitem a incorporação de células em implantes 3D, proporcionando um arranjo otimizado de células e materiais [16].

Em trabalhos anteriores do grupo de estudo, *scaffolds* de vidro bioativo 58S foram produzidos pelo método *freeze-casting* utilizando misturas de naftaleno-cânfora como solvente, e a estrutura precisou ser sinterizada a temperaturas de 1250°C para que as partículas coalescessem. Apesar da bioatividade dos *scaffolds* de 58S ter sido alta, atingiram resistência mecânica de somente $1,5 \pm 0,3$ MPa. Para melhorar a resistência à compressão e contornar a necessidade de temperaturas nas quais o vidro 58S cristaliza, trabalhos seguintes utilizaram o vidro 13-93 feito por sol-gel, que possui temperatura de fusão próxima à 650°C. Como resultado, os corpos de prova atingiram resistência de $22,4 \pm 3,1$ MPa, entretanto a cinética de produção da camada de hidroxiapatita foi atrasada e a bioatividade foi menor.

Para equilibrar propriedades mecânicas e bioatividade, neste trabalho, foram produzidos vidros bioativos 58S e 13-93 pelo método sol-gel e suas partículas utilizadas para fabricação de *scaffolds* compósitos nas proporções percentuais de massa 58S/13-93 de 30/70, 50/50 e 70/30 por meio do processo *freeze-casting* utilizando água como solvente. Entretanto, *scaffolds* puramente cerâmicos possuem corpo verde frágil e de difícil manuseio, sua estrutura sinterizada é suscetível à fratura devido à sua estrutura porosa, caracterizada por regiões de elevada porosidade interconectada que enfraquecem as ligações mecânicas entre as partículas.

A fim de contornar essas limitações, a segunda parte deste trabalho se refere à produção de *scaffolds* compósitos de vidro 58S, que mantém a bioatividade e o polímero PVA com alta massa molecular, que garante reforço mecânico à estrutura no processo *freeze-casting*. Diferentes proporções percentuais em massa entre 58S/PVA foram utilizadas para verificar suas influências nas propriedades do material e os valores 80/20, 90/10 e 95/05 foram adotados devido à solubilidade máxima do PVA utilizado em água e a viscosidade final da solução.

Na terceira parte desta tese, foi desenvolvido um processo sol-gel para que uma porção inorgânica, de mesma composição do vidro 58S, e uma orgânica de PVA pudessem ser processadas juntas e houvesse uma ligação mais íntima entre as fases. O gel resultante com proporção 50/50 entre fases foi utilizado em um processo de impressão 3D para criação de *scaffolds* tridimensionais. Essa parte do trabalho foi desenvolvida durante o período de intercâmbio do programa CAPES PrInt, no Imperial College – London, sob orientação do professor Julian Jones e seu grupo de pesquisa.

Os *scaffolds* produzidos neste trabalho procuram preencher demandas de práticas medicinais e comercial que ainda não puderam ser atendidas. Vidros bioativos comerciais como Bioglass[®] (45S5), Bonalive[®] (S53P4) e Osteoform[®] são vendidos como partículas ou grânulos de preenchimento, mas não possuem nenhuma função estrutural nem apresentam arquitetura tridimensional estudada que possibilite o fluxo de nutrientes e células. Dispositivos da Osteopore[®] como Osteomesh[®], Osteoplug[®] possuem arquitetura tridimensional, mas são formados apenas de polímeros que não são capazes de induzir rapidamente a formação da camada de hidroxiapatita em sua superfície. Materiais similares de preenchimento já existem comercialmente no mercado, até mesmo compósitos de policaprolactona e β -trifosfato de cálcio, mas não há dispositivos compósitos ou híbridos com arquitetura tridimensional de vidros bioativos com capacidade de suportar cargas. Além disso, até o momento, não há registros na literatura de estudos que explorem a obtenção de *scaffolds* de VB/PVA utilizando o método de *freeze-casting*, nem híbridos desses materiais por manufatura aditiva. Isso reforça a originalidade deste trabalho.

A Figura 1.1 ilustra os trabalhos experimentais executados neste projeto apresentado em formato de artigos. Cada capítulo após a revisão se refere a uma rota diferente, mas que compartilha alguns materiais e técnicas de caracterização.

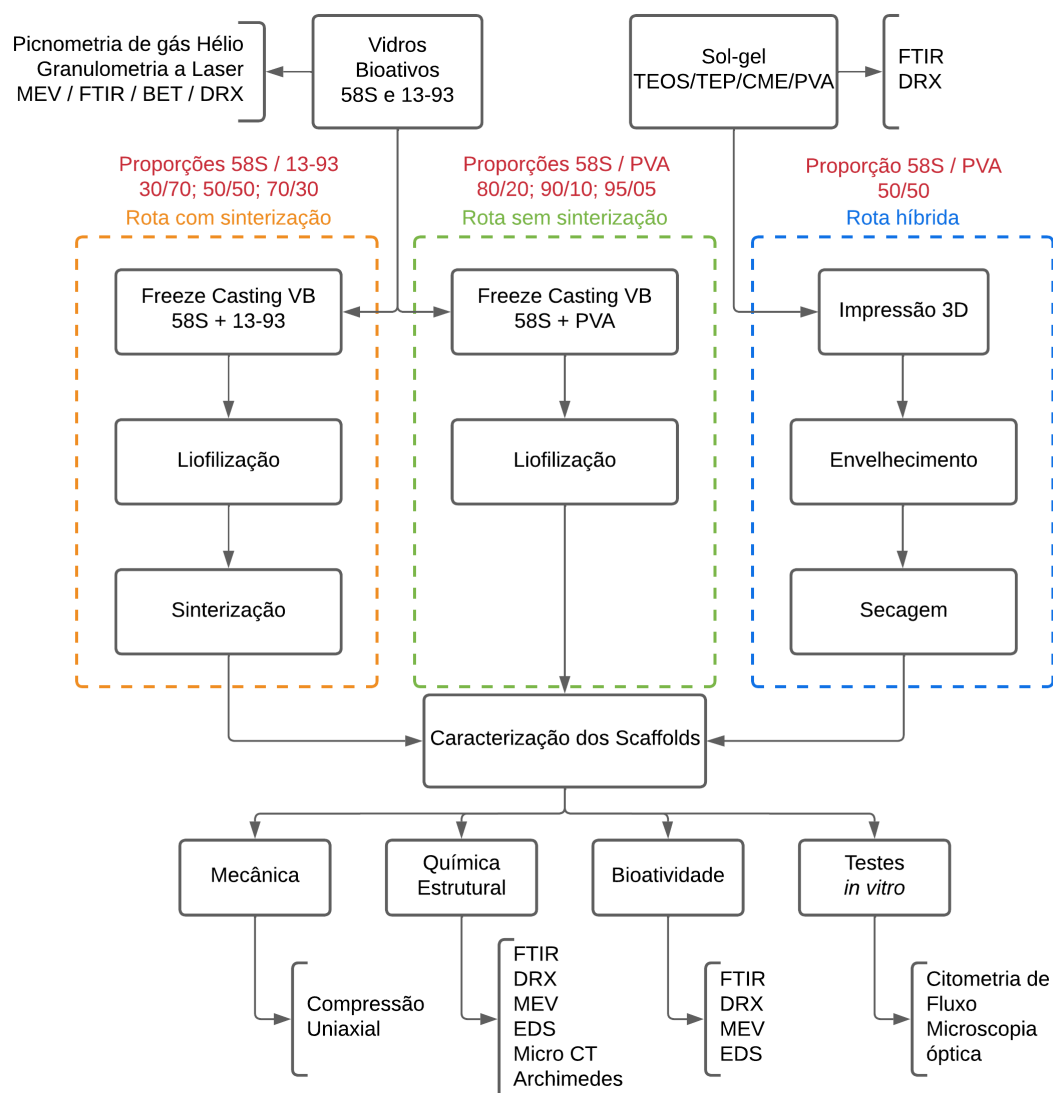


Figura 1.1 - Fluxograma das etapas na produção de *scaffolds* deste trabalho.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho visa avaliar a influência das proporções de VB 58S, VB 13-93 e PVA nos processos de fabricação, porosidade, morfologia de poros, cristalinidade, resistência mecânica, bioatividade e citotoxicidade de *scaffolds* com potenciais propriedades osteogênicas ao empregar os processos de *freeze-casting* e impressão 3D.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desse trabalho podem ser definidos como segue:

- Sintetizar micropartículas de VBs 58S e 13-93 pelo método sol-gel.
- Avaliar as partículas de vidro preparadas quanto às ligações químicas existentes por FTIR, cristalinidade por DRX, área superficial específica por BET e morfologia de partículas cominuídas por MEV
- Produzir *scaffolds* compósitos de VBs 58S/13-93 com 20% de volume de sólidos e proporções percentuais m/m de 30/70, 50/50 e 70/30 utilizando o processo de *freeze-casting*, utilizando água como meio refrigerante.
- Produzir *scaffolds* compósitos de 58S/PVA com 20% de volume de sólidos e proporções percentuais m/m de 80/20, 90/10 e 95/05 utilizando o processo de *freeze-casting*, utilizando água como meio refrigerante
- Sintetizar material híbrido vítreo, de composição derivada do VB 58S, utilizando TEOS, TEP e CME como precursores e com adição de PVA durante o processo sol-gel na proporção m/m de 50/50.
- Produzir *scaffold* do material híbrido utilizando o processo de impressão 3D com porosidade acima de 50%

- Estudar a estrutura dos poros por MEV, micro-CT e testes de Arquimedes além da resistência mecânica por ensaio de compressão uniaxial dos materiais obtidos por *freeze-casting*, estabelecendo uma correlação entre esses parâmetros e a composição do material.
- Avaliar a bioatividade dos *scaffolds* por meio da produção da camada de HA em ensaio em imersão em SBF, analisada por FTIR, DRX, MEV e EDS e correlacionar com a velocidade de formação de HA
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos *scaffolds* preparados por meio de co-cultivos de células MRC-5 com seus extratos via ensaio de citometria de fluxo e microscopia óptica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ENGENHARIA DE TECIDOS

3.1.1. Histórico e evolução

A engenharia de tecidos é uma área interdisciplinar da ciência e engenharia biomédica que visa a criação de tecidos funcionais para restaurar, manter ou melhorar a função de tecidos ou órgãos danificados. Este campo combina princípios de biologia celular e ciência dos materiais para desenvolver substitutos biológicos que combinam três componentes essenciais: células, matrizes (ou *scaffolds*) e sinais bioquímicos. As células, geralmente derivadas do próprio paciente (autólogas), são cultivadas em um *scaffold* biocompatível que proporciona suporte estrutural e guia a formação do novo tecido. Os sinais bioquímicos, que podem ser fatores de crescimento ou outras moléculas sinalizadoras, são incorporados ao *scaffold* para dirigir a proliferação e diferenciação celular de maneira controlada [17].

Os *scaffolds* desempenham um papel crucial na engenharia de tecidos, servindo como arcabouços tridimensionais que mimetizam a matriz extracelular natural do tecido em desenvolvimento. Para serem regenerativos, os *scaffolds* devem ser biocompatíveis, preferencialmente biodegradáveis e possuir uma arquitetura porosa que permita a difusão de nutrientes e a remoção de resíduos. Materiais como polímeros biodegradáveis, cerâmicas bioativas e hidrogéis são frequentemente utilizados para a fabricação de *scaffolds* devido às suas propriedades ajustáveis e compatibilidade com diferentes tipos de tecidos [18].

A utilização de biomateriais remonta a civilizações antigas, como Grécia, Roma e Egito, onde materiais naturais, como metais e tendões de animais, eram empregados no reparo de ferimentos e como substitutos de partes danificadas do corpo. No Egito Antigo, tecidos biológicos eram suturados com tendões de animais, enquanto na Europa do século XVI, metais como ouro e prata começaram a ser usados em reparos dentários e na fixação de ossos quebrados [19]. Apesar de serem práticas iniciais, esses usos demonstravam uma consciência precoce dos fatores de durabilidade e biocompatibilidade, que se tornariam centrais no desenvolvimento de biomateriais. Ao longo dos séculos, a evolução dos biomateriais refletiu uma compreensão crescente dos materiais aplicados à medicina,

integrando conhecimentos de biologia, química e ciência dos materiais para desenvolver implantes e tratamentos cada vez mais seguros e eficazes.

Assim como a expectativa e o estilo de vida evoluíram ao longo do tempo, os biomateriais também sofreram mudanças, com marcos definidos por alterações na composição e funcionalidade. Os biomateriais de primeira geração eram predominantemente inertes, priorizando a função mecânica em detrimento da biocompatibilidade. Nessa fase, a interação entre o material e os tecidos biológicos era menos preocupante, frequentemente resultando em complicações imunológicas severas, especialmente com próteses metálicas. Materiais como aço inoxidável, titânio e ligas de cobalto-cromo eram amplamente utilizados por sua resistência mecânica e durabilidade. No entanto, esses metais apresentavam problemas de corrosão e liberação de íons metálicos, o que podia levar a respostas inflamatórias e alergias em alguns pacientes, além de causar lesões em tecidos moles adjacentes devido à sua dureza [20,21]. Materiais cerâmicos, como alumina e zircônia, foram usados por sua dureza e resistência ao desgaste, especialmente em aplicações ortopédicas e odontológicas. No entanto, sua fragilidade limitava o uso em situações sujeitas a altas tensões e cargas dinâmicas. Polímeros, como o polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE), passaram a ser empregados por sua flexibilidade e baixa densidade, mas enfrentavam problemas de desgaste e degradação ao longo do tempo [22,23].

Com o passar do tempo, houve maior foco na aceitação biológica de enxertos e implantes levando à busca por substitutos mais eficazes que impulsionou o desenvolvimento de materiais que imitam estruturas orgânicas em termos de interação com o tecido vivo, bioatividade e reabsorção. Esse avanço resultou no surgimento dos biomateriais de segunda geração [24]. Materiais cerâmicos, anteriormente usados por sua inércia química, passaram a ser modificados para melhorar a biocompatibilidade, embora suas limitações mecânicas, como baixa resistência à tração, restringissem seu uso em algumas aplicações. Paralelamente, polímeros como o poli(ácido láctico) (PLA) e o poli(ácido glicólico) (PGA) ganharam destaque por sua capacidade de ajustar propriedades mecânicas durante o processamento e por sua alta compatibilidade biológica [25].

Cada nova geração de biomateriais incorpora características das gerações anteriores e introduz novas funções para aprimorar o desempenho. Reconhecendo que o ambiente

fisiológico frequentemente exige estruturas complexas e funções variadas, os biomateriais de terceira geração se concentram na reprodução de componentes biológicos completos fora do corpo para terapias de substituição. Eles utilizam *scaffolds* de materiais sintéticos ou naturais como suporte para células e moléculas bioativas após o implante [26]. Apesar das dificuldades enfrentadas, as funções dos biomateriais são diversas, alguns substituem porções do corpo ou órgãos, outros têm funções diagnósticas para identificar anomalias, e ainda há aqueles que oferecem características terapêuticas para otimizar a regeneração e o tratamento. Destacam-se também os biomateriais com funções de armazenamento, que exibem liberação controlada de fármacos (*drug delivery systems*) [27]. Independentemente da bioatividade, o controle da interface biomaterial-tecido vivo é crucial, dada a grande diferença entre as propriedades físicas nas interfaces [11]. No contexto do tecido ósseo, as propriedades mecânicas estão associadas, em grande parte, à combinação da hidroxiapatita carbonatada (HAC - componente rígido) e fibras colágenas (componente elástico). Portanto, um material projetado para desempenhar funções similares também deve possuir uma combinação adequada dessas propriedades, utilizando elementos combinados como vidros bioativos e polímeros [11].

Polímeros como o PLA e o poliuretano são frequentemente utilizados devido à sua biocompatibilidade e capacidade de degradação controlada, mas suas resistências mecânicas e bioatividade são limitadas [28,29]. Ao incorporar polímeros às cerâmicas bioativas, como hidroxiapatita ou vidros bioativos, esses compósitos exibem propriedades aprimoradas, como maior tenacidade, resistência à compressão e capacidade osteoindutora, características cruciais para a regeneração óssea eficiente [30–33]. Essa sinergia entre polímeros e cerâmicas possibilita a criação de *scaffolds* mais eficazes para a regeneração de tecidos duros, combinando a flexibilidade e processabilidade dos polímeros com a bioatividade e resistência das cerâmicas. O resultado é a produção de materiais personalizados para diversas aplicações clínicas [34]. Alguns materiais híbridos que combinam componentes orgânicos e inorgânicos têm surgido como uma solução inovadora e versátil na área de biomateriais, integrando propriedades desejáveis de ambos os tipos de materiais em nível molecular [35]. Estudos recentes mostram que *scaffolds* híbridos de nanocompósitos de hidroxiapatita e colágeno não apenas suportam o crescimento celular, mas também promovem a mineralização óssea de forma mais eficiente do que materiais puramente orgânicos ou inorgânicos [36,37]. Comparados aos compósitos tradicionais, os materiais híbridos oferecem várias vantagens, incluindo

maior resistência à tração e flexão, além de maior estabilidade térmica, propriedades essenciais para aplicações estruturais [38].

Apesar dos avanços, a engenharia de tecidos enfrenta vários desafios que limitam sua aplicação clínica em larga escala. Um dos principais desafios é a vascularização dos tecidos criados em laboratório. Para que os tecidos sejam funcionais, é necessário que eles desenvolvam uma rede de vasos sanguíneos capaz de fornecer nutrientes e remover resíduos [39]. A falta de vascularização adequada pode levar à necrose do tecido após a implantação. Abordagens atuais para resolver este problema incluem a incorporação de fatores angiogênicos nos *scaffolds* e a co-cultura de células endoteliais com outros tipos de células para promover a formação de vasos sanguíneos [16,40].

Acompanhando os avanços em termos de materiais, os processos de fabricação permitiram escalar estruturas complexas e de organizações intrincadas para mimetizar tecidos como a impressão 3D. A bioimpressão 3D permite a deposição camada por camada de células e materiais biocompatíveis para criar estruturas tridimensionais de quarta geração que replicam com precisão a anatomia do tecido alvo, Figura 3.1. Esta tecnologia tem o potencial de revolucionar o transplante estruturas, permitindo a produção de órgãos personalizados que são compatíveis com o sistema imunológico do paciente, reduzindo o risco de rejeição [41].

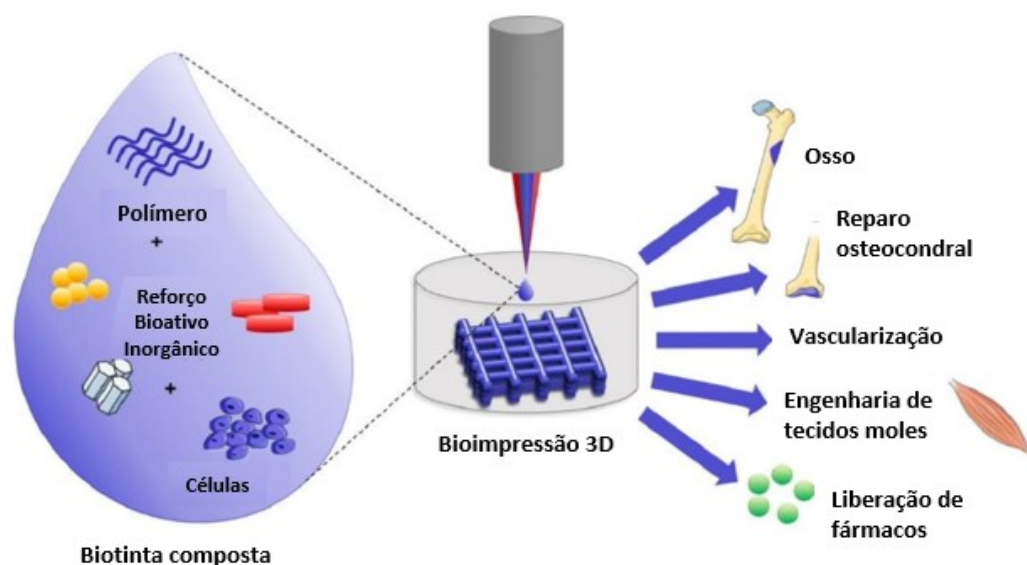


Figura 3.1 - Composição de biotinta incluindo a matriz extracelular (orgânica/inorgânica) e biológica. Fonte adaptada [42]

Esse campo tem avançado nas últimas décadas, com aplicações que abrangem desde a regeneração de pele e cartilagem até o desenvolvimento de órgãos mais complexos, como fígado e coração [41]. Um dos exemplos mais bem-sucedidos de engenharia de tecidos é o desenvolvimento de pele artificial para o tratamento de queimaduras severas. Produtos como o Integra®, que combina uma matriz de colágeno com uma camada de silicone, têm sido amplamente utilizados em clínicas para promover a regeneração da pele e reduzir a necessidade de enxertos autólogos [43]. Produtos biologicamente funcionais, criados por meio de bioimpressão ou biomontagem e processos subsequentes de maturação de tecidos, resultaram na criação de outros órgãos inteiros, como corações e rins funcionais, que sobreviveram fora do corpo humano, em sistemas controlados, por alguns dias [44].

A engenharia de tecidos ósseos tem avançado com o desenvolvimento de biomateriais inovadores e a incorporação de células vivas em estruturas tridimensionais. Biotintas compostas por gelatina metacrilada, nanofios e células-tronco mesenquimais da medula óssea demonstraram promover regeneração óssea quase completa em modelos animais, combinando propriedades mecânicas aprimoradas e imunomodulação eficiente [45]. Da mesma forma, implantes de nanofibras de poli(ϵ -caprolactona) associados a microtecidos tridimensionais de osteoblastos humanos aceleraram a mineralização e a regeneração óssea em estudos pré-clínicos. Essas descobertas destacam o potencial de estratégias baseadas em células-tronco e arcabouços sintéticos para enfrentar desafios na reparação de defeitos ósseos, marcando uma nova era na nanomedicina regenerativa e, para tanto o conhecimento das estruturas e funções de cada tecido é fundamental [46].

3.1.2. Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido altamente especializado que desempenha várias funções críticas no corpo humano, incluindo suporte estrutural, proteção dos órgãos internos, facilitação do movimento através da ancoragem muscular e armazenamento de minerais como cálcio e fósforo [47]. Além dessas funções, o tecido ósseo também atua como um reservatório de células hematopoiéticas na medula óssea, onde ocorre a produção de células sanguíneas [48].

Do ponto de vista estrutural, macroscopicamente, o osso pode ser dividido em dois tipos principais: o osso cortical, também conhecido como osso compacto, e o osso trabecular,

ou esponjoso. O osso cortical constitui a camada externa dos ossos e é extremamente denso, fornecendo resistência mecânica e proteção. O osso trabecular, por outro lado, está localizado no interior dos ossos longos e nas extremidades dos ossos planos, apresentando uma estrutura porosa que facilita a absorção de choques e a distribuição de cargas [49].

O tecido ósseo é composto principalmente por uma matriz extracelular mineralizada que confere rigidez e resistência composta principalmente por colágeno tipo I, que constitui a fase orgânica, e cristais de hidroxiapatita, que compõem a fase mineral do osso [50]. O colágeno tipo I é uma molécula longa e fibrosa composta por três cadeias polipeptídicas, duas alfa-1 ($\alpha 1$) e uma alfa-2 ($\alpha 2$), que se entrelaçam para formar uma tripla hélice. Essa estrutura helicoidal confere ao colágeno sua alta resistência à tração e estabilidade térmica [51]. O outro componente, a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), é um fosfato de cálcio cristalino que é a principal fase mineral do osso, responsável por cerca de 70 % do peso seco do tecido ósseo. A estrutura da hidroxiapatita é hexagonal, e sua rede cristalina é composta por íons cálcio (Ca^{2+}), fosfato (PO_4^{3-}) e hidroxila (OH^-), que organizados e orientados na matriz colágena são críticos para as propriedades mecânicas do osso [52].

A organização das fases colágena e mineral no osso é altamente hierárquica: a nível molecular, o colágeno tipo I forma fibrilas que são mineralizadas por cristais de hidroxiapatita. Essas fibrilas se agrupam em fibras maiores que se organizam em lâminas, que por sua vez se organizam em ósteons. Essa estrutura hierárquica mostrada na Figura 3.2 permite ao osso suportar cargas mecânicas enquanto mantém a leveza estrutural [53].

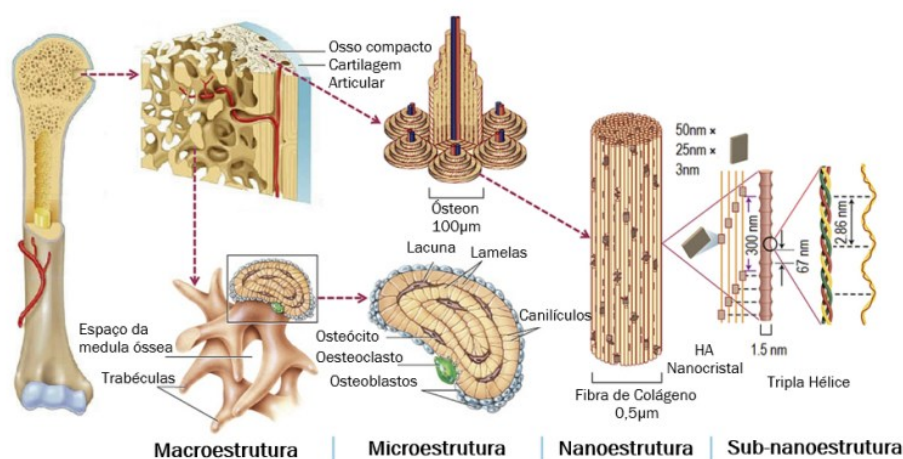


Figura 3.2 - Organização das estruturas orgânicas e inorgânicas presentes no osso de escala macro para a nano. Fonte adaptada [54].

A resistência à compressão do osso cortical é em torno de 170 MPa, enquanto sua resistência à tração é de aproximadamente 120 MPa. A combinação de colágeno e hidroxiapatita também proporciona ao osso uma excelente resistência à fratura, uma propriedade essencial para a proteção contra lesões e para o suporte das funções biomecânicas do esqueleto humano [55]. As propriedades mecânicas do osso trabecular são fortemente influenciadas pela sua densidade aparente e pela orientação das trabéculas. A densidade aparente do osso trabecular varia amplamente entre diferentes locais anatômicos e entre indivíduos, influenciando diretamente sua resistência mecânica [56].

Além dessas duas fases que compõe a maior parte da matriz extracelular desse tecido, as células presentes no tecido ósseo incluem osteoblastos, que são responsáveis pela síntese da matriz óssea; osteócitos, que são osteoblastos maduros incorporados na matriz; e osteoclastos, que são células responsáveis pela reabsorção óssea. Os dois primeiros necessitam de alto contato com fluidos para sustentação e, por isso, demandam estruturas altamente porosas, já o último está enclausurado no tecido compacto e se comunica com células adjacentes através de prolongamentos citoplasmáticos nos pequenos canais existentes. O equilíbrio entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos é fundamental para a manutenção da homeostase óssea e para a remodelação contínua do tecido ósseo [57].

A engenharia de tecidos ósseos visa a regeneração de defeitos ósseos que não se curam de forma adequada através dos mecanismos naturais do corpo, como grandes fraturas ou defeitos causados por ressecções tumorais. Este campo combina técnicas de engenharia e biologia para desenvolver substitutos biológicos que possam restaurar, manter ou melhorar a função do tecido ósseo. Uma abordagem comum envolve o uso de *scaffolds* tridimensionais biocompatíveis que servem como suporte para o crescimento celular e formação de nova matriz óssea. Esses *scaffolds* são projetados para imitar a estrutura porosa do osso trabecular, permitindo a invasão celular, a vascularização e a deposição de matriz óssea [49]. Materiais como cerâmicas bioativas, polímeros biodegradáveis e compósitos são amplamente utilizados na fabricação desses [18].

Os materiais utilizados na engenharia de tecidos ósseos devem possuir uma combinação de propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam a osteocondução, osteoindução e osteogênese. A osteocondução refere-se à capacidade do material de

suportar o crescimento de células ósseas na superfície do *scaffold*, enquanto a osteoindução envolve a capacidade do material de induzir a diferenciação de células progenitoras em osteoblastos [49,50]. A osteogênese é a formação direta de novo tecido ósseo por células presentes no *scaffold*.

Cerâmicas bioativas, como a hidroxiapatita e o fosfato de cálcio, são frequentemente utilizadas na engenharia de tecidos ósseos devido à sua semelhança com a fase mineral do osso natural e sua capacidade de promover a osteocondução. Vidros bioativos preservam essas funções, com a possibilidade de incorporar bioatividades específicas como angiogênese, anti-inflamatória, bactericida, entre muitas outras [58,59]. Essa flexibilidade de formulação, propicia soluções para quadros clínicos que necessitam materiais multifuncionais e serão estudados adiante.

3.2. VIDRO BIOATIVO

A classe de vidros bioativos abrange uma ampla gama de materiais utilizados na medicina regenerativa, especialmente na engenharia de tecidos ósseos. Essa tecnologia teve início na década de 1960, graças ao trabalho pioneiro do Prof. Larry Hench e seus colaboradores [60,61]. Este vidro bioativo, denominado 45S5, possui a seguinte composição química (% em massa): 45 % SiO_2 , 24,5 % CaO , 24,5 % Na_2O e 6 % P_2O_5 . Sua criação foi uma conquista histórica, representando uma inovação revolucionária em biomateriais e levando à produção comercial do Bioglass® [62,63]. Este material é amplamente reconhecido não apenas por sua biocompatibilidade, mas também por sua capacidade de estimular a regeneração óssea. Ele promove interações bioquímicas específicas com tecidos vivos e fluidos biológicos, resultando na formação de uma camada de hidroxiapatita em sua superfície [64–66].

Há diversos tipos de vidros bioativos, que podem ser classificados com base na composição e nas suas propriedades. Os mais comuns incluem os vidros bioativos silicatados, fosfatados e boratados. Vidros silicatados, como o Bioglass® 45S5, são amplamente utilizados devido à sua alta bioatividade e capacidade de formar ligações fortes com os ossos. Vidros fosfatados, por sua vez, são conhecidos por sua solubilidade controlável, o que os torna adequados para aplicações onde a taxa de degradação é crucial [67].

Novas composições e processos de fabricação diferentes da fusão vem sendo criados para atender às demandas mais específicas. Os VBs com composição molar 60 % SiO_2 , 36 % CaO e 4 % P_2O_5 , também denominado 58S; o 77S com 80 % SiO_2 , 16 % CaO , 4 % P_2O_5 e muitos outros começaram a serem sintetizados com algumas variações, como exemplo o vidro 13-93 6 % Na_2O , 7,9 % K_2O , 7,7 % MgO , 22,1 % CaO , 1,7 % P_2O_5 e 54,6 % SiO_2 [68–70]. O expressivo teor de CaO nesse material e sua razão $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ o tornam altamente reativo em meios aquosos, promovendo ligações estáveis com o osso e com o tecido cartilaginoso [71]. No início do período pós-implante e as reações superficiais rápidas in vivo levam à rápida dissolução iônica e à formação da camada de hidroxiapatita carbonatada. A liberação de íons solúveis de Si, Ca e P pode ativar a expressão gênica e estimular a proliferação de osteoblastos para rápida formação óssea [72].

Vidros ricos em Na_2O , como o vidro bioativo 45S5, apresentam uma baixa temperatura de transição vítrea (T_g), o que, embora útil em alguns contextos, torna-os propensos à cristalização durante o processamento térmico, devido à estreita janela entre a temperatura de transição vítrea e o início da cristalização, 550-600 °C e 610-630 °C [73]. Em contrapartida, vidros bioativos livres de Na_2O geralmente possuem altas temperaturas de transição vítrea, com os valores de T_g aumentando proporcionalmente ao teor de silício. Por exemplo, o vidro bioativo 58S, sintetizado pelo método sol-gel convencional, apresenta um valor de T_g de até 785 °C, enquanto o vidro 13-93 tem uma T_g próxima de 595 °C [74].

Esse comportamento térmico e a determinação da janela de trabalhabilidade do material são fundamentais durante processos de sinterização cerâmica, uma técnica amplamente utilizada na fabricação de *scaffolds* para regeneração óssea. A sinterização cerâmica é impulsionada pela redução da relação área superficial/volume do material, uma vez que a superfície de um material é considerada uma região de alta energia, portanto, um defeito superficial. Durante a sinterização, as partículas se aproximam, formando "pescoços" entre elas e levando à redução volumétrica do material. Ao final do processo, há uma diminuição da área superficial específica, permitindo que o sistema alcance uma condição de menor energia livre [75]. Contudo, essa redução da área superficial impacta negativamente a bioatividade do vidro.

Estudos do grupo de pesquisa mostraram que o tratamento abaixo de 1250 °C por 2 horas não é capaz de sinterizar *scaffolds* porosos, mas forma fases cristalinas mesmo em vidros de teores mais altos de sílica como o 58S [76]. Esse efeito e caracterização é mostrado na Figura 3.3 e por isso, o VB13-93, que possui maior faixa de trabalho devido à adição de óxidos, será escolhido para a primeira parte desse trabalho.

É bem estabelecido que a cristalização do VB diminui sua bioatividade, uma vez que a mobilidade de íons e a reatividade do material ficam mais limitadas [77,78]. No entanto, vários trabalhos relatam o uso de vitrocerâmicas para aplicações de suporte de carga em engenharia de tecido ósseo [79–81].

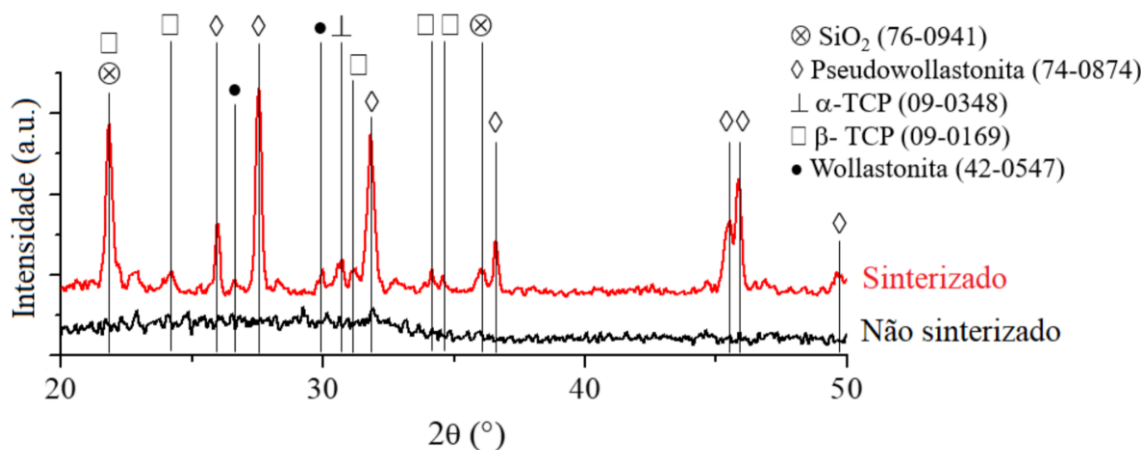


Figura 3.3 – Difratograma de amostras de VB 58S sinterizado á 1250 °C e não sinterizado evidenciando a formação de fases cristalinas.

As propriedades mecânicas dos vidros bioativos, incluindo sua resistência à compressão, elasticidade e dureza, são geralmente inferiores às de outros biomateriais, como os metais e cerâmicas tradicionais. No entanto, sua capacidade de formar ligações com o osso compensa essa limitação em muitas aplicações clínicas.

Os desafios na aplicação dos vidros bioativos incluem o controle sobre a taxa de dissolução no corpo humano e a compatibilidade mecânica com os tecidos nativos, levando ao desenvolvimento de híbridos para controlar esses parâmetros. O desenvolvimento de novos vidros com composições ajustáveis para casos clínicos específicos, é contínuo, seja prevenindo que o osso seja reabsorvido por atividade osteoclástica em vidros com magnésio [82,83] ou favorecendo a formação de vasos

sanguíneos em formulações com cobalto [84,85]. Além da composição, os processos pelos quais o vidro bioativo passa pode interferir em suas características, por isso, integração de técnicas de fabricação avançadas como a impressão 3D, estão abrindo caminho para a próxima geração de vidros bioativos personalizados [86].

Embora os vidros bioativos sejam amplamente conhecidos por sua aplicação em ortopedia e odontologia, seu potencial em outras áreas médicas está ganhando reconhecimento. A aplicação de vidros bioativos em sistemas de liberação de medicamentos, por exemplo, oferece uma abordagem para o tratamento de doenças ósseas infecciosas ou cancerígenas, onde a liberação local e controlada de fármacos é desejável [87].

3.2.1. Métodos de Produção

Enquanto Hench originalmente produziu o Bioglass® utilizando a abordagem de fusão e têmpera, o processo sol-gel tem ganhado considerável atenção nas últimas décadas [88]. Materiais sol-gel podem ter estrutura de poros, tamanho de partículas e morfologia de superfície personalizados [89,90]. Tais propriedades podem ser úteis para promover a migração, adesão, proliferação e diferenciação celular, favorecendo assim a reparação tecidual [91]. Além disso, o processo sol-gel oferece possibilidades praticamente ilimitadas para a produção de vidros com uma ampla variedade de composições, o que está levando a inovações no campo da medicina regenerativa.

O processo de fusão é um dos métodos tradicionais e mais amplamente utilizados na produção de vidros bioativos. Esse processo envolve a mistura de matérias-primas em pó, homogeneização para garantir uma distribuição uniforme dos componentes químicos, e inseridas em um forno de alta temperatura, onde é aquecido até a fusão completa, tipicamente entre 1.350 °C e 1.500 °C [63]. Durante a fusão, os materiais passam por reações químicas que resultam na formação de uma massa fundida homogênea. Esse estágio é crucial, pois a temperatura de fusão deve ser suficientemente alta para permitir a dissolução completa dos componentes, mas controlada para evitar a decomposição de elementos voláteis, como o óxido de fósforo, que é essencial para a bioatividade do vidro [92].

Após a fusão, a massa vítrea fundida é resfriada rapidamente para evitar a cristalização, um processo conhecido como têmpera. O resfriamento rápido, ou têmpera, impede a formação de cristais e garante que o vidro retenha sua estrutura amorfa, que é essencial para a bioatividade. A velocidade de resfriamento pode ser ajustada para controlar as propriedades finais do vidro, como a resistência mecânica e a porosidade, que são fundamentais para sua aplicação em biomateriais [92].

O processo de sol-gel é uma técnica de síntese amplamente utilizada na produção de vidros bioativos, oferecendo vantagens em termos de controle sobre a composição química e a microestrutura do material. Diferente do método de fusão tradicional, o processo de sol-gel ocorre a temperaturas mais baixas, o que permite a incorporação de componentes que seriam instáveis em condições de alta temperatura. Este processo envolve a transição de uma solução coloidal (sol) em uma rede sólida (gel) através de reações de hidrólise e condensação dos precursores metálicos, geralmente alcóxidos de silício sob ação de agente catalizador ácido ou básico [93].

No início do processo sol-gel, os precursores, como tetraetoxissilano (TEOS), são dissolvidos em um solvente e submetidos à hidrólise, resultando na formação de partículas coloidais dispersas no solvente. Estas partículas, que são os "sols", começam a reagir entre si através de uma série de reações de condensação, formando ligações Si-O-Si e criando uma rede tridimensional. A transição do estado sol para o estado gel ocorre à medida que essa rede se torna contínua e o sistema perde sua fluidez, formando o "gel" [94,95]. Este gel contém uma grande quantidade de solvente preso em sua estrutura porosa, que será posteriormente removido por meio de secagem controlada

Após a gelificação, o material passa por um processo de secagem para remover o solvente residual e evitar o colapso da estrutura porosa. A secagem é um passo crítico, pois o controle sobre a taxa de evaporação do solvente pode influenciar a porosidade e a microestrutura final do vidro. Uma secagem lenta em atmosfera controlada é geralmente preferida para manter a integridade da rede porosa. Em seguida, o gel seco é submetido a um tratamento térmico em temperaturas que variam de 500 °C a 700°C, para remover os grupos orgânicos remanescentes e densificar a estrutura vítrea sem causar cristalização [96]. Esses processos para a produção de vidro bioativo podem sofrer modificações em

suas variáveis ou serem interrompidas para atender às aplicações do material, mas seguem a ordem de hidrólise e condensação conforme mostrado na Figura 3.4.

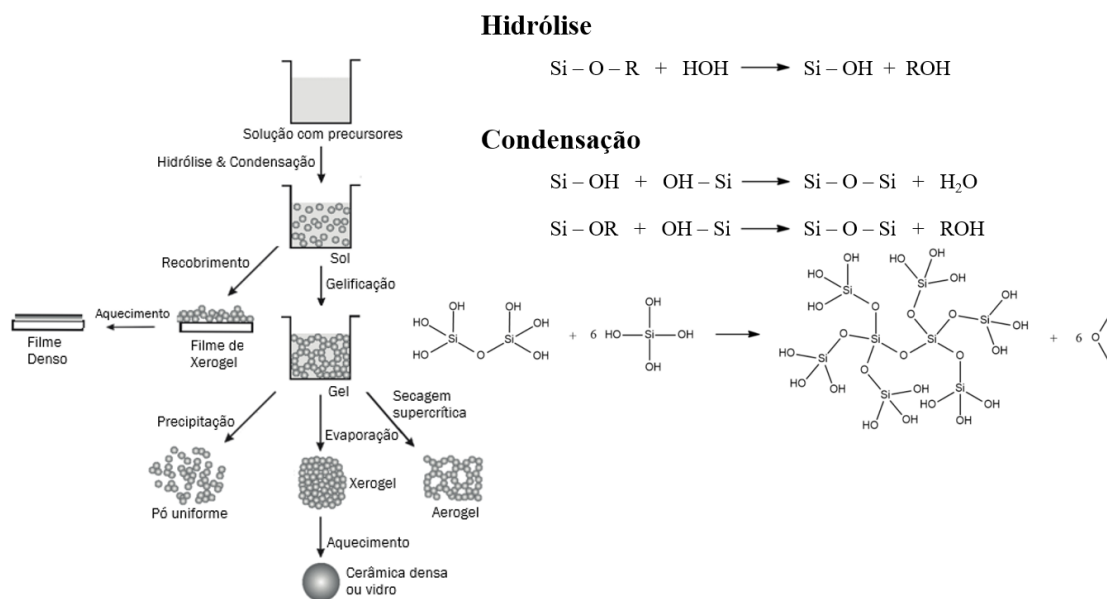


Figura 3.4 - Processo de formação diferentes produtos pelo método sol-gel. Fonte adaptada: [95,97].

Quando óxidos modificadores de rede são adicionados no processo sol-gel, a estrutura tridimensional do vidro é interrompida, aumentando a quantidade de oxigênios não ligantes como mostrado na Figura 3.5 [98]. Essa interrupção na conectividade da rede implica em alteração da cinética química, velocidade de formação de camada de hidroxiapatita, temperatura de cristalização e de transição vítrea [99,100].

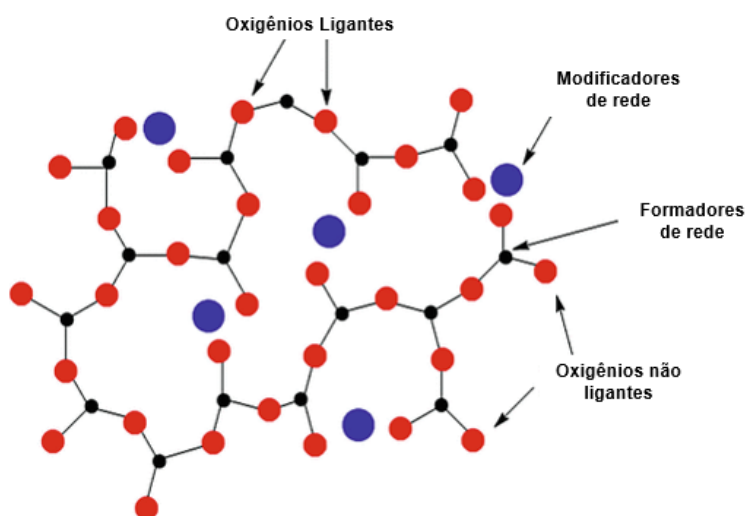


Figura 3.5 - Rede bidimensional com átomos formadores e modificadores de rede [98].

Lins *et al.* [101] modificaram a rota originalmente proposta por Pereira e colaboradores [102] no intuito de obter nanopartículas de VB. A utilização de materiais em escalas nanométricas aumenta superfície de contato, o que facilita a sinterização e acelera as reações necessárias para a bioatividade, tornando essa rota modificada uma alternativa com funções mais alinhadas com o propósito do trabalho. Todavia, apenas pequenas quantidades de material são obtidas por meio dessa rota, o que torna inviável sua utilização quando um grande volume de vidro é necessário para produção de um elevado número de estruturas tridimensionais em diversas proporções entre os vidros utilizados no trabalho, e por isso foi descartada.

Diferentemente do vidro 58S, que possui tanto rotas de fusão quanto sol-gel bem estudadas, a produção do vidro 13-93 é bastante detalhada na literatura quando se trata de métodos de fusão dos precursores, entretanto a rota sol-gel do vidro 13-93 ainda é escassa, visto que somente poucos artigos foram encontrados na literatura [70,99,100,103,104]. A bioatividade desse vidro pelo método sol-gel é limitada, visto que área superficial específica menor que $5 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ é um fator que atrasa a formação de hidroxiapatita em relação aos vidros 58S e 45S5 [13]. Encontrar meios de aumentar a bioatividade do vidro 13-93 ou alternativas para utilizá-lo sem perder a bioatividade do *scaffold* em comparação com dispositivos feitos por outros vidros já conhecidos são fatores que impulsionam o melhor detalhamento desse material e novas soluções a serem descritas para a literatura.

3.2.2. Bioatividade

A bioatividade dos vidros bioativos é uma característica central que define sua capacidade de interagir com tecidos biológicos, promovendo a regeneração óssea e a integração dos implantes com o tecido circundante. Esta propriedade foi inicialmente descoberta com o desenvolvimento do Bioglass® 45S5, o primeiro material capaz de formar uma ligação direta com o osso através da formação de uma camada de hidroxiapatita na sua superfície. A bioatividade desses vidros decorre da sua composição química, que, ao ser colocada em contato com fluidos biológicos, desencadeia uma série de reações que levam à formação de uma camada mineral semelhante à da matriz óssea natural.

A primeira etapa envolve a formação de grupos silanol (Si-OH), que ocorre devido à troca dos modificadores de rede do vidro pelos íons H^+ presentes no meio. Em seguida, a sílica da rede é perdida e transforma-se em sílica solúvel para posterior condensação e a formação de uma nova camada de sílica pura, o que leva à migração de íons $(PO_4)^{3-}$ e Ca^{2+} devido à baixa concentração desses elementos na nova camada formada. Como resultado, fosfato de cálcio é depositado na superfície, completando sua cinética química com a absorção de íons $(CO_3)^{2-}$ e OH^- , culminando na formação de HAC. [80,105], Figura 3.6. Esses processos induzem uma série de eventos celulares, incluindo a ação de macrófagos e a geração da matriz óssea cristalizada, resultando no crescimento do osso [11].

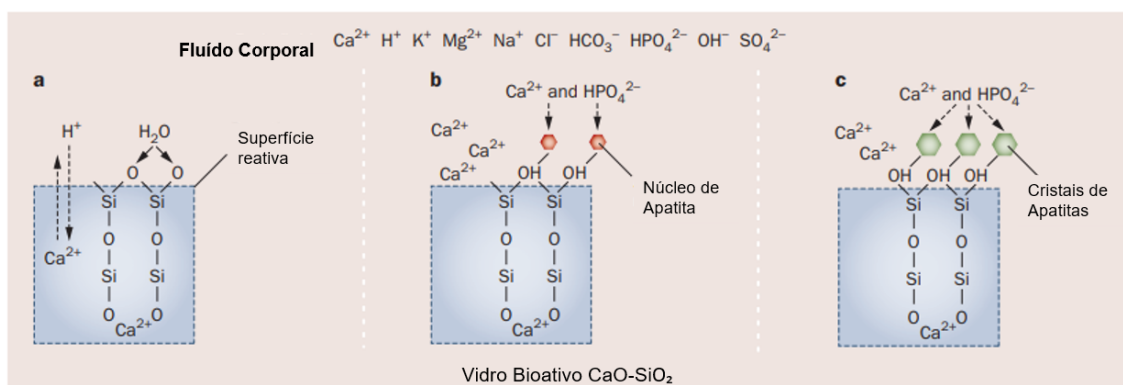


Figura 3.6 – Reações de um vidro com cálcio em fluido corporal. Fonte adaptada [106].

A composição química dos vidros bioativos é um fator crucial na determinação da sua bioatividade. Vidros com maior conteúdo de sílica tendem a apresentar menor bioatividade devido à sua estrutura mais estável e menos solúvel. Por outro lado, a presença de óxidos como CaO e P_2O_5 é fundamental para a rápida formação de hidroxiapatita e, conseqüentemente, para a bioatividade. Além disso, a adição de elementos como o boro e o sódio pode ser ajustada para modular a taxa de dissolução do vidro, o que, por sua vez, afeta o tempo de resposta bioativa e a formação da camada de apatita [107].

A Figura 3.7(a) exibe um corte por MEV de fêmur de rato com implante de VB (porção mais clara e central) após duas semanas, no qual observa-se a interface entre implante e tecido ósseo (círculo branco), a Figura 3.7(b) é a ampliação do círculo em destaque

evidenciando a camada rica em sílica, seguida de uma camada de HA mais externa e então o osso do animal [108,109].

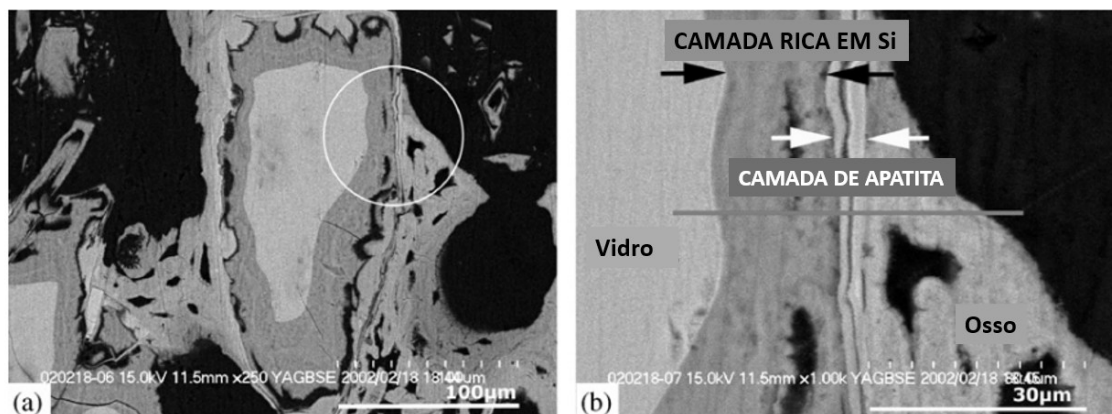


Figura 3.7 - Corte histológico em MEV de implante de vidro bioativo em osso. Em (a) corte de um implante de VB (porção mais clara e central) em tecido ósseo. Em (b) a região destacada pelo círculo branco está ampliada Fonte: Adaptado [110]

3.2.3. Vidro Bioativo 58S

O vidro bioativo 58S possui a composição % m/m 58:33:9 de $\text{SiO}_2:\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5$ e foi desenvolvido como uma alternativa ao Bioglass® 45S5, com o objetivo de melhorar certas propriedades, como a bioatividade e a taxa de dissolução. Este material é altamente reativo em ambientes aquosos devido ao seu alto teor de CaO e à sua proporção $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ que favorece sua integração através de fortes ligações com os tecidos ósseos e cartilagosos [68].

Uma das características marcantes do vidro 58S é sua porosidade controlada, que é essencial para a integração com o tecido ósseo. A porosidade elevada, que pode ser ajustada durante o processo de fabricação, permite uma maior área de superfície específica para a adesão celular e a penetração de vasos sanguíneos em valores maiores que $250 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ [111]. Em termos de propriedades mecânicas, o vidro bioativo 58S, embora bioativo, possui limitações devido à sua fragilidade inerente aos materiais vítreos. No entanto, a incorporação de 58S em compósitos com polímeros ou a sinterização controlada podem melhorar a resistência mecânica, sem comprometer a bioatividade. [112]

Durante a fase inicial pós-implantação, a alta área de superfície específica do vidro 58S derivado de sol-gel promove reações de superfície *in vivo*, levando à rápida dissolução iônica e à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada. Este processo é crucial porque desencadeia a liberação de íons solúveis de Si, Ca e P, que, por sua vez, ativam a expressão gênica e estimulam a proliferação de osteoblastos, acelerando assim a formação óssea [72]. No entanto, o vidro 58S tem uma temperatura de cristalização relatada de cerca de 650 °C, provavelmente devido à segregação de fosfato de cálcio da sílica durante o processo de desidratação [113,114]. Essa segregação e subsequente cristalização podem não apenas dificultar o processo de sinterização, mas também reduzir a bioatividade e a biodegradabilidade do vidro

3.2.4. Vidro Bioativo 13-93

O vidro bioativo 13-93, recentemente reportado, possui a seguinte composição química: % m/m 53:20:12:6:5:4 de SiO₂:CaO:K₂O:Na₂O:MgO:P₂O₅ [115]. Devido à presença de modificadores de rede, como K₂O, Na₂O e MgO em sua composição, este material tem uma tendência reduzida à cristalização e uma temperatura de fusão mais baixa do que outros vidros bioativos, já o MgO contribui para aumentar a rigidez da rede vítrea. Como resultado, ele possui uma ampla janela entre a temperatura de transição vítrea e a temperatura de cristalização (T_c), o que promove a sinterização por fluxo viscoso e resulta em uma densificação superior sem induzir cristalização [103,116].

Além disso, tanto o CaO quanto o MgO têm demonstrado contribuir para a cinética de reação de superfície, promovendo a formação de novo osso e melhorando a adesão e a estabilidade das células ósseas [117]. No entanto, o vidro 13-93 geralmente possui uma baixa área de área específica, o que pode impactar negativamente sua taxa de dissolução e comportamento biológico [118].

Uma das principais vantagens do vidro 13-93 é sua resistência mecânica, que o torna particularmente adequado para aplicações em regiões do esqueleto sujeitas a cargas elevadas, como a coluna vertebral e os membros inferiores. Na literatura, *Scaffolds* com 80 % de porosidade apresentam resistência à compressão de $0,9 \pm 0,1$ MPa para o vidro 58S enquanto para o vidro 13-93 e 60% de porosidade o valor é de $16,0 \pm 2,0$ Mpa [119,120]. Essa resistência é alcançada através de sua composição equilibrada, que inclui

óxidos alcalinos e alcalino-terrosos, conferindo ao material uma estrutura robusta e menos propensa à fratura durante o uso clínico [13]. Esse fator é crítico para a durabilidade dos implantes e sua capacidade de suportar as demandas mecânicas do corpo humano.

Alternativas para aumentar a resistência mecânica de *scaffolds* para aplicações biomédicas tem sido a combinação desses vidros com polímeros, como o PLA, o PVA e o poli(ácido glicólico) (PGA). A adição de longas cadeias poliméricas melhora a processabilidade e faz com que o material não colapse rapidamente durante a compressão devido à união entre as partículas por esse novo componente da estrutura [121]

3.3. POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)

Os polímeros biomédicos têm uma história de desenvolvimento impulsionada pelo crescente interesse na substituição ou reparo de tecidos biológicos. A introdução desses materiais começou no século XX, com a descoberta de polímeros sintéticos como o polietileno e o polipropileno, que foram rapidamente adotados para a fabricação de dispositivos médicos devido à sua durabilidade e resistência. Desde então, o campo expandiu-se significativamente, abrangendo uma vasta gama de polímeros naturais e sintéticos com propriedades personalizadas para aplicações biomédicas específicas [122].

Os processos de fabricação de polímeros biomédicos variam amplamente, dependendo das propriedades desejadas e das aplicações finais. A polimerização em solução e em massa são métodos tradicionais, utilizados para produzir polímeros com controle preciso de massa molecular e distribuição de massa molecular. Além disso, técnicas mais avançadas, como a eletrofiação e a impressão 3D, têm sido exploradas para criar estruturas poliméricas complexas que imitam o ambiente natural dos tecidos biológicos, oferecendo maior controle sobre a morfologia e a bioatividade dos materiais [123].

Os polímeros de interesse biomédico podem ser classificados em várias categorias, incluindo polímeros naturais, como colágeno e ácido hialurônico, e polímeros sintéticos, como o poli(ácido lático) e o poliuretano [124]. Cada tipo de polímero oferece vantagens específicas; por exemplo, polímeros naturais são frequentemente biocompatíveis e bioabsorvíveis, enquanto polímeros sintéticos permitem a manipulação de propriedades

como resistência mecânica, plasticidade e ponto de fusão dependendo do grau de polimerização do material produzido, da cristalinidade e interação entre cadeias [125].

A bioabsorção é outra característica vital, particularmente em aplicações onde o material deve ser gradualmente substituído pelo tecido nativo. Polímeros bioabsorvíveis, como o PLA e o poli(glicolídeo) (PGA), são amplamente utilizados em suturas, dispositivos de liberação controlada de fármacos e *scaffolds* para engenharia tecidual. Outros polímeros como o PVA e o poli(vinilpirrolidona), apesar de não serem metabolizados pelo organismo do hospedeiro, são degradáveis por hidrólise. Materiais bioabsorvíveis ou hidrolisáveis são projetados para se degradarem em produtos não tóxicos que podem ser eliminados pelo corpo, eliminando a necessidade de remoção cirúrgica. Além das propriedades citadas, é essencial que os polímeros utilizados apresentem superfície compatível com a adesão e proliferação celular, e que suas propriedades mecânicas sejam adequadas ao sistema no qual será introduzido [122].

Exemplos de produtos biomédicos baseados em polímeros incluem stents bioabsorvíveis, dispositivos de liberação controlada de fármacos e *scaffolds* para regeneração óssea. Um exemplo notável é o stent coronariano bioabsorvível feito de PLA, que fornece suporte estrutural temporário para vasos sanguíneos após uma intervenção coronariana e é gradualmente absorvido pelo corpo, reduzindo o risco de complicações a longo prazo [126].

Em 1924, o poli(álcool vinílico) foi o primeiro coloide sintético produzido por Herrmann e Haehnel pela polimerização do monômero acetato de vinila em acetato polivinílico [127]. Com mais de 650 mil toneladas produzidas por ano, o PVA é um dos polímeros mais utilizados pela indústria [128]. Devido à sua considerável resistência química e propriedades físicas versáteis, o PVA é aplicado em diferentes indústrias como na de adesivos, proteção para polimerização em emulsão, têxteis, produção de fibras de PVA e adesivos de papel [127]. Acredita-se que os grupos hidroxila presentes no monômero do PVA, Figura 3.8, têm o potencial de alterar a ligação superficial entre a matriz e o reforço e essa capacidade é um dos fatores que garante suas aplicações na medicina e indústria de alimentos [129]. O PVA é um polímero sintético que pertence a classe de polímeros não iônicos solúveis em água contendo um grupo vinil. Não é tóxico e, portanto, é considerado seguro para manuseio e ambientalmente amigável [130]. O PVA é inodoro,

insípido, translúcido e está disponível na forma de pó granulado, pequenos pellets de cores brancas à marfim.

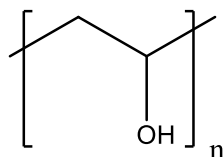


Figura 3.8 - Monômero do PVA com hidroxila

3.3.1. Síntese de PVA

O PVA é obtido a partir da polimerização do acetato de vinila (VA) por adição iniciada por radicais livres, Figura 3.9, e possui três etapas bem estudadas: iniciação, propagação e terminação [131]. O resultado é o poli(acetato de vinila) (PVAc), que é posteriormente hidrolisado em PVA.

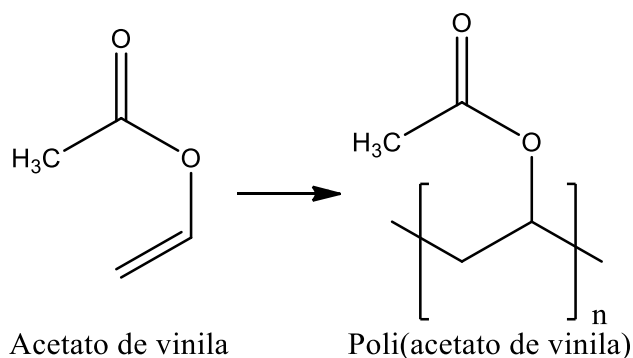


Figura 3.9 - Acetato de vinilia (à esquerda) utilizado para a síntese do PVAc (monômero) à direita. Fonte: própria

A iniciação, Figura 3.10, é caracterizada pela clivagem da ligação covalente formando radicais que são adicionados à dupla ligação do acetato de vinila [132].

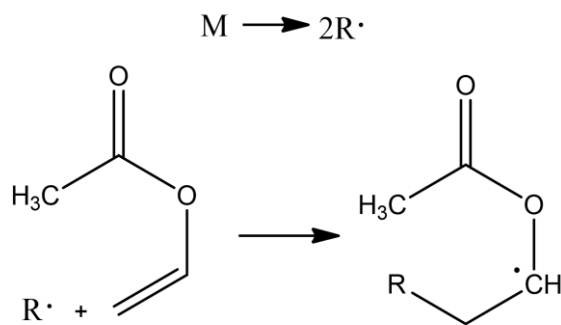


Figura 3.10 - Ataque à insaturação do acetato de vinila e início da polimerização. Fonte: própria

Na etapa seguinte, denominada propagação, os monômeros têm sua dupla ligação atacada pelos radicais poliméricos, Figura 3.11. O aumento da massa molar e consequentemente da cadeia polimérica, se dá nessa fase e é proporcional ao tempo no qual a reação acontece.

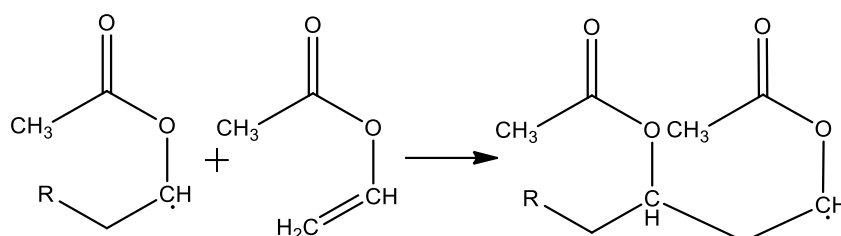


Figura 3.11 - Etapa de propagação. Fonte: própria

A síntese se encerra na etapa de terminação por combinação ou desproporcionamento nos quais os radicais poliméricos crescentes encontram outros radicais, Figura 3.12 [133].

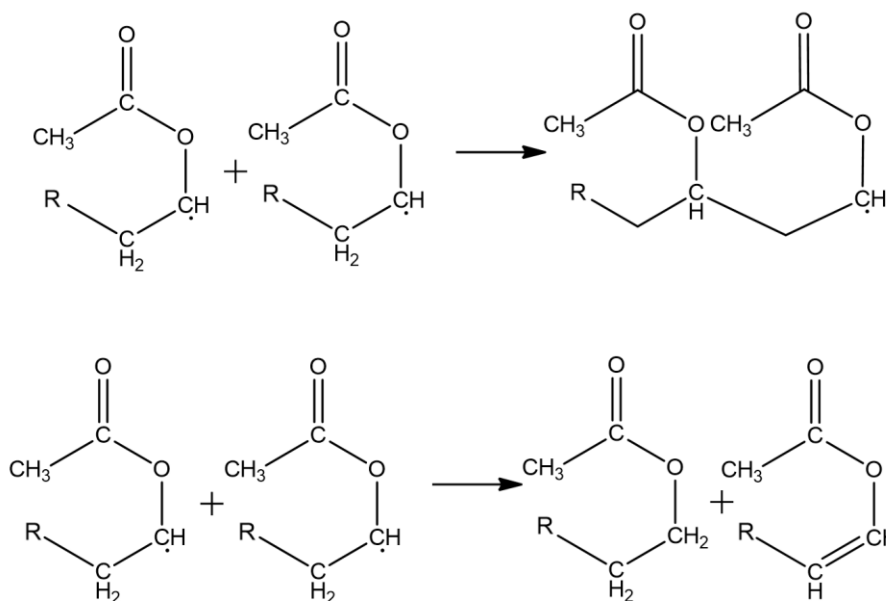
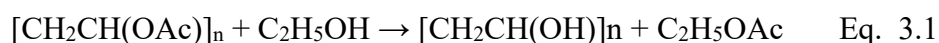


Figura 3.12 - Reação de combinação (acima) e desproporcionamento (abaixo).

Fonte: própria

O PVA não é sintetizado como os outros polímeros de vinil, utilizando o monômero correspondente. A instabilidade do álcool vinílico e sua tautomerização em acetaldeído faz com que a rota mais viável seja a hidrólise do poli(acetato de vinila), Eq. 3.1 [134].



3.3.1. Propriedades mecânicas e químicas

Os graus de pureza do PVA disponíveis comercialmente possuem massa molecular variando entre 20.000 e 400.000 g.mol⁻¹. O comprimento inicial do polímero de acetato de vinila e o seu grau de hidrólise sob condições alcalinas ou ácidas geram produtos com flexibilidade, solubilidade, aderência e resistência à tração diferentes [130]. As propriedades do PVA dependem substancialmente do seu peso molecular e grau de hidrólise, dentre essas propriedades, vale citar ponto de fusão, índice de refração, pH e viscosidade [130,135]. Quando totalmente hidrolisado, o PVA é solúvel em água quente e têm boas características de formação de filme, bem como boas propriedades adesivas [135]. No entanto, quando parcialmente hidrolisado o PVA é solúvel em água e ligeiramente solúveis em etanol, mas é insolúvel em solventes orgânicos [134].

O PVA apresenta alta resistência à tração e flexibilidade, bem como baixa permeabilidade ao oxigênio. Possui excelentes propriedades de formação de filme, emulsificação e adesiva, além de ser resistente a óleos, graxas e solventes. A absorção de água pelas cadeias do PVA pode torná-lo mais plástico, o que reduz a resistência à tração do polímero, mas aumenta seu alongamento e tenacidade. Alguns parâmetros podem ser observados na Tabela 3.1 abaixo, na qual o aumento ou diminuição da massa molar e grau de hidrólise tem efeito sobre suas propriedades [127].

Tabela 3.1 - Reforço de propriedades em relação à variação da massa molar e grau de hidrólise

| | Aumento | Diminuição |
|--------------------------|---|---|
| Massa molar | Resistência a solventes Resistência mecânica Viscosidade Dispersão Adesão | Sensibilidade à água Flexibilidade |
| Grau de hidrólise | Resistência mecânica Resistência a solventes Adesão (superfícies hidrofílicas) | Dispersão Flexibilidade Sensibilidade à água Adesão (superfícies hidrofílicas) |

Por ser um polímero atático, de ramificações pequenas e com grupos de fortes interações, o PVA exibe cristalinidade. Em termos de microestrutura, é composto principalmente de

ligações 1,3-diol $[-CH_2 - CH(OH) - CH_2 - CH(OH) -]$, mas uma pequena porcentagem de 1,2-dióis $[-CH_2 - CH(OH) - CH(OH) - CH_2 -]$ ocorrem.

Essa natureza semicristalina confere ao polímero uma propriedade mecânica interessante, combinando maior resistência à tração em comparação com muitos polímeros amorfos e maior ductilidade em relação a muitos polímeros cristalinos. Na Figura 3.13, é ilustrado um exemplo do processo de alongamento de um polímero semicristalino, assim como o efeito da temperatura em suas propriedades mecânicas. Inicialmente, as cadeias da fase amorfa se estendem até que as porções emaranhadas (entanglements) sejam completamente esticadas. Somente após essa etapa, a fase cristalina começa a ser tracionada [136,137]. Sabe-se também que o aumento da temperatura pode elevar o limite de ruptura do material, pois pode fazê-lo ultrapassar a temperatura de transição vítrea (T_g). A T_g é uma das propriedades relevantes em aplicações de polímeros, visto que várias propriedades físicas e químicas estão diretamente relacionadas a ela. Portanto, o comportamento do polímero sob tração inicial envolve o alongamento das cadeias amorfas até o estiramento completo das porções emaranhadas, seguido pelo início da tração na fase cristalina [138,139].

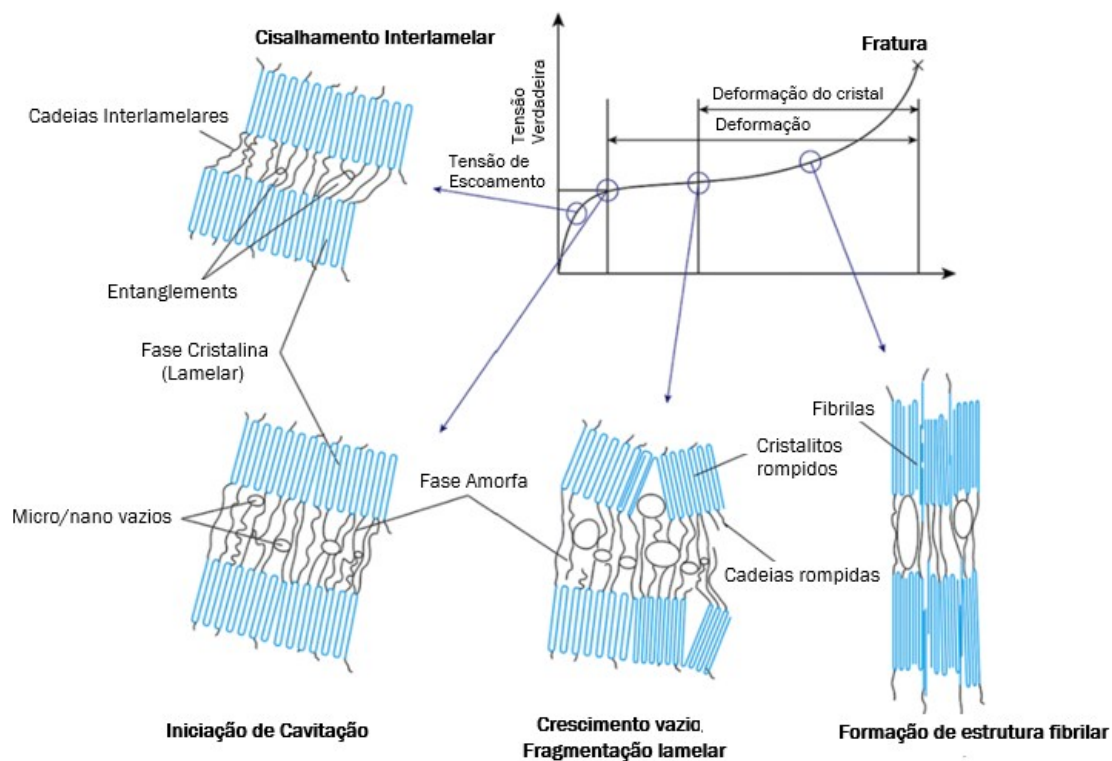


Figura 3.13 - Comportamento das fases amorfas e cristalina de um polímero semi-cristalino durante a tração. Fonte adaptada: [140]

3.3.2. Biocompatibilidade

O PVA é empregado em uma variedade de aplicações médicas devido à sua biocompatibilidade, baixa tendência para adesão de proteínas e baixa toxicidade. Por isso, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA permite que o PVA seja usado como um aditivo em produtos que estão em contato direto com alimentos, próteses e equipamento oftalmológicos, além de estruturas de diálise [130]. Atualmente, os polímeros à base de PVA vem sendo amplamente usados como aditivos na fabricação de produtos inteligentes. É possível criar comprimidos carregados de drogas com características de liberação controlada, nos quais o PVA é usado como uma substância aglutinante [141].

Microesferas de PVA reticulado também são empregadas na liberação controlada de drogas orais. Soluções oftálmicas como lágrimas sintéticas também podem conter PVA por fornecerem boa dispersão e propriedades de revestimento. O PVA é aprovado para o uso em várias aplicações médicas incluindo adesivos transdérmicos, na preparação de géis secativos aplicados na pele e em formulações de comprimidos de liberação imediata e sustentada [142].

Na literatura, extensivos trabalhos utilizam o PVA para a fabricação de compósitos cerâmicos poliméricos com finalidades diversas como curativos para regeneração e liberação de fármacos para pele, implantes ósseos e recobrimentos de próteses metálicas, hidrogéis injetáveis para aplicações em tecido ósseo, entre muitas outras [143–145]. Em função do bom desempenho em condições fisiológicas já reportadas na literatura, esse polímero foi escolhido como fase de reforço dos *scaffolds* de VB produzidos na segunda parte trabalho.

3.4. COMPÓSITOS

Materiais compósitos são formados pela combinação de dois ou mais materiais com propriedades físicas ou químicas distintas, resultando em um material com características superiores às de cada componente individual. Tipicamente, os compósitos consistem em uma matriz, que atua como o elemento contínuo e mantém a forma geral do material, e

um reforço, que proporciona resistência e rigidez, interagindo de forma predominantemente física [10].

Na engenharia de tecidos, os compósitos desempenham um papel crucial, especialmente no desenvolvimento de *scaffolds* que mimetizam a matriz extracelular (ECM) dos tecidos biológicos. A ECM é uma estrutura complexa que fornece suporte físico às células, além de desempenhar funções bioquímicas e biomecânicas cruciais para a manutenção da homeostase celular. *Scaffolds* compósitos são projetados para replicar estas funções, facilitando a adesão, proliferação e diferenciação celular, promovendo assim a regeneração de tecidos [17].

Materiais compósitos podem ser classificados com base na natureza da matriz e do reforço. A matriz é o componente contínuo que envolve e mantém os outros materiais em sua posição, enquanto o reforço é o componente que confere ao compósito suas propriedades mecânicas aprimoradas. Os Compósitos de Matriz Cerâmica (CMC) são frequentemente utilizados em aplicações que requerem alta resistência à temperatura e resistência ao desgaste, os CMCs empregam cerâmicas como matriz, combinadas com fibras ou partículas poliméricas, metálicas ou mesmo cerâmicas como reforço.

A seleção da matriz e do reforço é fundamental para o design de *scaffolds* compósitos. A matriz deve ser biocompatível, degradável ou bioinerte, dependendo da aplicação, e deve possuir propriedades mecânicas adequadas para suportar o crescimento celular e a formação de tecido. Os reforços, por sua vez, podem ser fibras, partículas ou nanomateriais que melhoram as propriedades mecânicas e bioativas do compósito [105]. A distribuição do reforço pode ser orientada ou não, pode se localizar na região central ou superficial, e pode ser concentrada em pequenas áreas ou distribuídas pela matriz conforme a Figura 3.14 [146]. Por exemplo, hidroxiapatita (HA), um fosfato de cálcio presente no osso humano, é frequentemente utilizado como reforço na superfície de matrizes poliméricas para *scaffolds* ósseos devido à sua bioatividade e similaridade química com o osso (HONG; YU; KIM, 2009; WU et al., 2014).

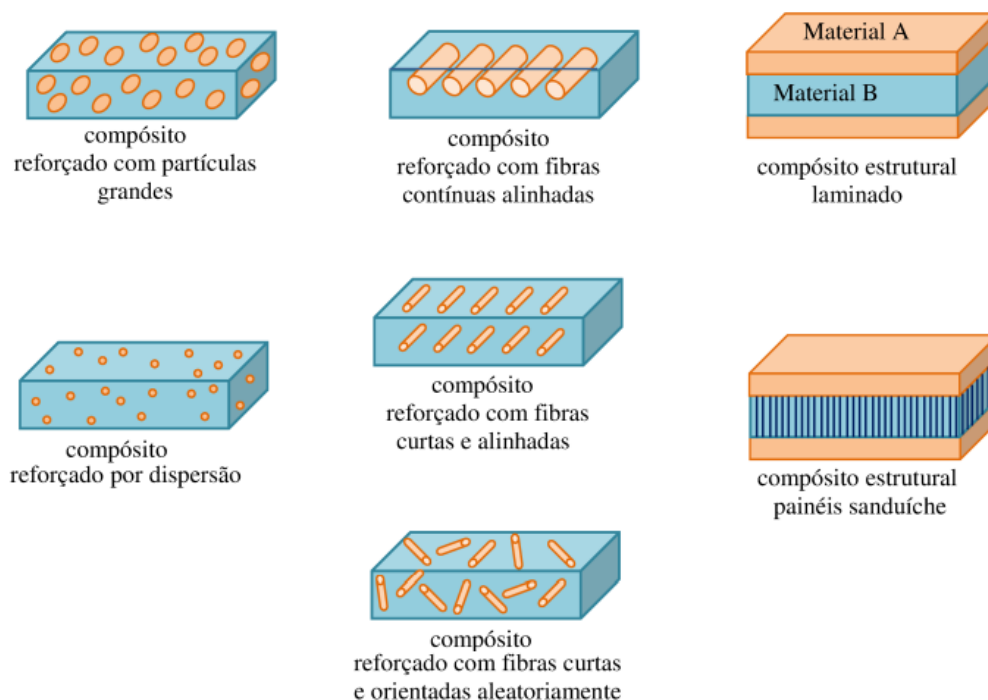


Figura 3.14 - Modelos representativos de compósitos com tipos e orientações de reforços em relação à matriz. Fonte: [146].

Compósitos cerâmicos/cerâmicos e cerâmico/poliméricos são de particular interesse na engenharia de tecidos devido à sua capacidade de combinar a bioatividade e resistência das cerâmicas, com a flexibilidade e processabilidade dos polímeros. Os compósitos cerâmico/poliméricos, por exemplo, são frequentemente utilizados em *scaffolds* para regeneração óssea, onde a cerâmica proporciona uma superfície favorável para a adesão celular e mineralização, enquanto o polímero oferece suporte estrutural e degradação controlada.

A utilização de PVA como reforço em matrizes de vidro bioativo na produção de *scaffolds* traz diversas vantagens que tornam essa combinação promissora na engenharia de tecidos e medicina regenerativa. O PVA é conhecido por suas excelentes propriedades mecânicas, como alta resistência à tração e boa elasticidade [149]. Quando incorporado em uma matriz de vidro bioativo, ele melhora a resistência e a durabilidade dos *scaffolds*, conferindo maior flexibilidade e capacidade de adaptação a ambientes anatômicos complexos. Além disso, o PVA é um material biocompatível e não tóxico, o que garante uma melhor integração com os tecidos biológicos, minimizando respostas inflamatórias e promovendo uma recuperação mais eficiente [10,150]. A facilidade de processamento

do PVA, seja por técnicas de eletrofição ou impressão 3D, permite a fabricação de *scaffolds* com estruturas complexas e porosidade controlada, essenciais para o sucesso em aplicações biomédicas. Assim, o PVA se destaca como um reforço valioso em matrizes de vidro bioativo, proporcionando uma combinação de propriedades que favorecem a regeneração tecidual de forma eficaz.

3.5. MATERIAIS HÍBRIDOS

Diferentemente dos compósitos, os híbridos envolvem uma integração mais íntima das fases em escalas nanométricas ou micrométricas. Nessas estruturas, as interações químicas desempenham um papel mais significativo, resultando em uma maior homogeneidade e interatividade entre os componentes, o que pode gerar novas propriedades que não estão presentes em nenhuma das fases puras. Nos híbridos, as fases podem estar molecularmente interligadas, um exemplo é o caso dos polímeros híbridos orgânico-inorgânicos, nos quais a fase orgânica (como um polímero) e a fase inorgânica (como um silicato) são conectadas quimicamente. Isso resulta em um material que combina as características de ambas as fases, mas com uma identidade estrutural e funcional nova e distinta [37,151].

A classificação dos híbridos pode ainda se dar conforme o grau de interação entre as fases. Em híbridos moleculares, as fases estão intimamente misturadas em nível molecular. Já em híbridos nanoestruturados, as fases são distinguíveis, mas se encontram em uma escala nanométrica, o que permite uma maior manipulação das propriedades do material. Nos híbridos microestruturados, as fases mantêm-se separadas em uma escala micro [152].

A classificação dos materiais híbridos em Tipos I e II é baseada na natureza das interações entre as fases constituintes e na organização estrutural dos componentes no material. Essa classificação oferece uma compreensão mais profunda de como as diferentes fases se combinam para formar um material híbrido e de como essas interações influenciam as propriedades finais do material. Os híbridos de Tipo I são caracterizados pela mistura das fases em um nível molecular, na qual as moléculas dos diferentes componentes estão tão intimamente misturadas que não há uma separação clara entre as fases. Em outras palavras, o material forma uma única fase contínua, unida por interações químicas, como ligações de hidrogênio ou por interações de van der Waals. Um exemplo de híbrido Tipo

I são os nanocompósitos de argila e polímeros, onde nanopartículas de argila conferem resistência mecânica e são dispersas em uma matriz polimérica que proporciona flexibilidade e processabilidade. Esses materiais são frequentemente utilizados em embalagens, dispositivos médicos e na indústria automotiva devido às suas propriedades mecânicas aprimoradas e à barreira eficiente contra gases [153]. Essas ligações desempenham um papel fundamental na estabilidade e nas propriedades desses materiais. [154].

Os híbridos de Tipo II, também conhecidos como híbridos nanoestruturados, apresentam fases separadas em escala nanométrica. Ao contrário dos híbridos Tipo I, onde as fases orgânicas e inorgânicas estão interligadas fisicamente, nos híbridos Tipo II as fases permanecem quimicamente unidas e distribuídas de maneira controlada em uma escala nanométrica. As interações entre as fases podem incluir ligações covalentes ou iônico-covalentes, e são mais fortes que as ligações presentes nos híbridos Tipo I [155]. Um exemplo típico de híbrido Tipo II são os materiais obtidos através do processo sol-gel, no qual compostos organossilanos (polímeros orgânicos contendo silício) são usados para formar uma rede tridimensional de silício que inclui grupos orgânicos de forma homogênea. Essa estrutura permite que o material combine propriedades de materiais inorgânicos, como resistência térmica e mecânica, com propriedades orgânicas, como flexibilidade e processabilidade. Esses híbridos são amplamente utilizados em aplicações como revestimentos protetores, sensores e sistemas de liberação controlada de fármacos [156].

Nos híbridos de Tipo III, as fases constituintes estão organizadas em uma escala microestrutural, com separação que varia de alguns micrômetros até dezenas de micrômetros. Esses materiais são compostos por duas ou mais fases que mantêm suas identidades individuais, mas estão fisicamente conectadas ou intimamente misturadas (PARK et al., 2020)[. Um exemplo é a combinação de fibras de vidro em uma matriz polimérica, onde a fase cerâmica fornece rigidez e resistência ao calor, enquanto a fase polimérica confere tenacidade.

A ciência dos materiais aborda a síntese dos híbridos, que pode ser realizada por métodos como o sol-gel, que permite a incorporação de polímeros em uma matriz cerâmica durante a formação do material, ou pela mistura física de componentes pré-formados, seguida de

um processamento adequado para garantir a integridade estrutural e funcionalidade do *scaffold*. Entre os tipos de materiais híbridos mais investigados na engenharia de tecidos, destacam-se os híbridos cerâmico-poliméricos. Estes materiais combinam a resistência e a rigidez das cerâmicas com a flexibilidade e a processabilidade dos polímeros. Um exemplo clássico é a hidroxiapatita combinada com polímeros biodegradáveis, como o poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA). A hidroxiapatita, quando incorporada em uma matriz polimérica como o PLGA, não só mantém a bioatividade da cerâmica, mas também melhora a processabilidade e controle sobre a degradação do material, ajustando-se melhor às necessidades do reparo tecidual ósseo [37,158].

Outro exemplo importante é o uso de vidros bioativos em combinação com polímeros. Vidros bioativos, como o Bioglass[®], têm a capacidade de formar uma camada de apatita na interface com os tecidos biológicos, promovendo a ligação óssea. Até mesmo propriedades elásticas e de autorregeneração de híbridos de vidro bioativo e polímeros já foram descritas na literatura devido à intrincada interação entre as fases com potencial de alterar as propriedades apresentadas por cada fase individualmente [159]. A combinação com polímeros biodegradáveis não apenas facilita o manuseio e a fabricação de *scaffolds* tridimensionais complexos, mas também permite a modulação das propriedades mecânicas e a taxa de degradação, tornando-os adequados para a regeneração de tecidos duros e moles [160].

3.6. PROCESSOS DE FABRICAÇÃO

A fabricação de biomateriais envolve uma gama diversificada de processos que visam obter propriedades específicas, como biocompatibilidade, resistência mecânica e capacidade de integração com tecidos vivos. Dentre os métodos de fabricação, destacam-se o *freeze-casting* e a impressão 3D, ambos inovadores e com potencial para criar estruturas complexas e personalizadas.

O *freeze-casting* é um processo que utiliza a solidificação direcional de soluções ou suspensões para produzir materiais com microestruturas porosas controladas, devido a isso, é relevante para a aplicação em *scaffolds* para regeneração óssea e de tecidos moles. Por outro lado, a impressão 3D, ou manufatura aditiva, permite a fabricação de biomateriais com geometrias precisas e personalizadas, facilitando a criação de implantes

e próteses ajustadas às necessidades individuais dos pacientes. Ambos os processos representam avanços significativos no campo da fabricação de biomateriais, possibilitando o desenvolvimento de soluções mais eficazes e adaptáveis às diversas demandas clínicas e serão abordados nos próximos tópicos.

3.6.1. *Freeze-casting*

A estrutura porosa dos biomateriais é conhecida por influenciar sua interação com tecidos vivos [161–163] e métodos tradicionais de fabricação frequentemente enfrentam dificuldades para controlar efetivamente essa propriedade. O processo de *freeze-casting*, também conhecido como "*ice templating*," é uma técnica de fabricação de materiais porosos que ganhou destaque na ciência dos materiais devido à sua capacidade de controlar a morfologia e a estrutura dos poros em uma variedade de materiais, como cerâmicas, polímeros e metais [164,165]. Na rota tradicional, o processo se baseia na solidificação do solvente presente em uma suspensão e no aprisionamento das partículas cerâmicas entre os cristais formados. Em uma fase subsequente de sublimação, o solvente é removido, resultando na formação de poros altamente organizados [166]. O material verde gerado pode então ser submetido a tratamentos térmicos para aumentar sua resistência mecânica ou para induzir a formação de novas fases estruturais [167], conforme exemplificado na Figura 3.16. Como a arquitetura dos poros formados é uma réplica direta da estrutura do solvente solidificado, é possível ajustar a morfologia dos poros variando o tipo ou quantidade de solvente utilizado na suspensão cerâmica [168,169].

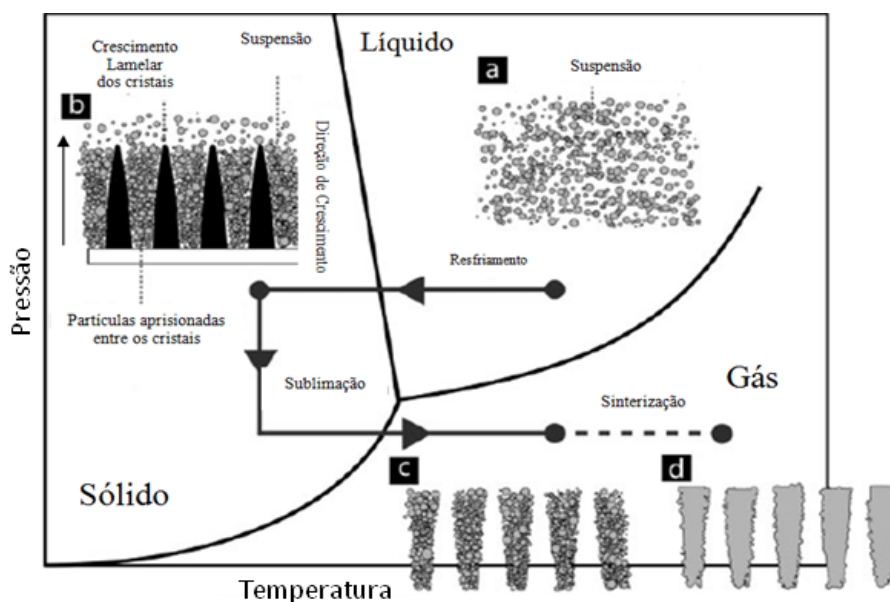


Figura 3.15 - Esquema das etapas envolvidas no processo *freeze-casting*. (a) Preparação da massa cerâmica; (b) Solidificação do solvente; (c) Sublimação; (d) Sinterização.

Fonte:[166,170].

A escolha dos parâmetros do processo é crucial para determinar as características finais do material. A granulometria das partículas na suspensão tem um papel fundamental, pois partículas menores tendem a seguir o avanço da frente de congelamento, resultando em uma distribuição mais homogênea e poros menores. Em contrapartida, partículas maiores podem ser empurradas pela frente de congelamento, criando poros maiores e uma estrutura mais heterogênea. A viscosidade da suspensão também é um parâmetro crítico pois suspensões com alta viscosidade limitam o movimento das partículas durante o congelamento, resultando em uma maior uniformidade da microestrutura porosa. Além disso, a concentração da suspensão afeta diretamente a densidade do corpo verde após a remoção do solvente, influenciando a resistência mecânica e a porosidade final do material [169]

Os solventes utilizados no *freeze-casting* desempenham um papel vital na morfologia dos poros. O solvente mais comum é a água, devido à sua alta energia de fusão e facilidade de manuseio e os poros formados são, em geral, lamelares conforme mostrado na Figura 3.17. Entretanto, solventes orgânicos, como a cânfora e a tert-butanol, são frequentemente utilizados para produzir microestruturas diferentes, como poros cilíndricos e prismáticos, Figura 3.18 [168,171–173].

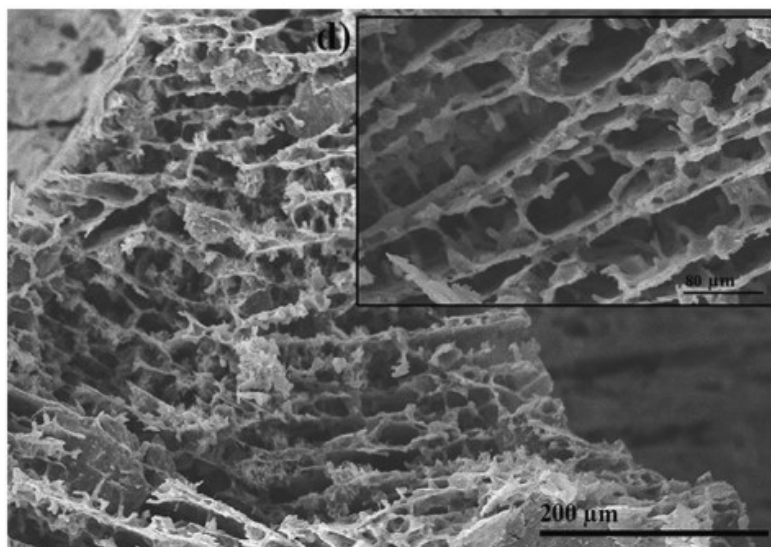


Figura 3.16 - Microscopia de *scaffold* de VB/água resfriado com nitrogênio líquido com estruturas de poros lamelares. Fonte: [174]

Cada material apresenta desafios específicos em termos de formulação da suspensão, controle de processo e sinterização. Por exemplo, em cerâmicas, a alta temperatura de sinterização é essencial para a densificação, mas pode levar ao colapso dos poros se não for cuidadosamente controlada [175]. No caso de inclusão de polímeros, a temperatura de sinterização da estrutura deve ser muito mais baixa, enquanto o controle do congelamento é crítico para evitar a cristalização indesejada do solvente, que pode afetar a morfologia dos poros.

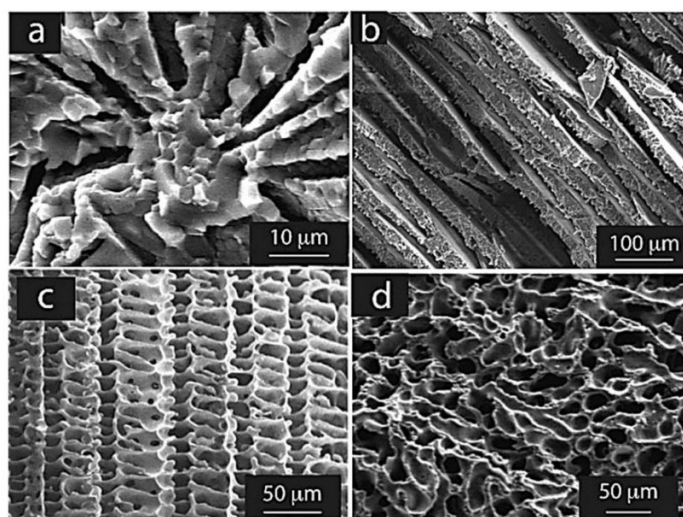


Figura 3.17 – Micrografias típicas de amostras preparadas via processo *freeze-casting*.

Em (a) alumina porosa com solvente de naftaleno-cânfora hipereutética, (b) alumina com água como solvente, (c) carbetto de silício e polycarbosilano e em (d) alumina com canfeno. Fonte:[166,170].

A escolha do solvente, combinada com a taxa de congelamento, determina o tamanho, a forma e a orientação dos poros. Uma taxa de congelamento mais rápida favorece a nucleação dos cristais do solvente em vez de seu crescimento e geralmente resulta em poros mais finos e anisotrópicos por congelar as partículas dentro dos cristais do solvente, enquanto uma taxa mais lenta favorece a formação de poros maiores e isotrópicos, por empurrar as partículas da frente de congelamento para regiões distantes da origem e produzem amostras com poros maiores e mais organizados [176]. A influência da velocidade de resfriamento pode ser observada na Figura 3.19.

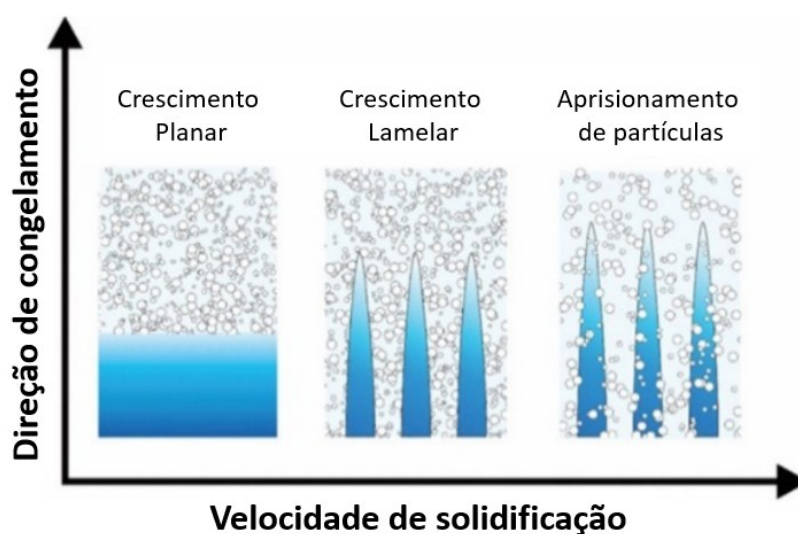


Figura 3.18 - Efeito da taxa de resfriamento sobre a estrutura de poros de material obtido por processo *freeze-casting*. (a), (b) e (c) se referem, respectivamente, a baixa, moderada e elevada taxas de resfriamento. Fonte: [177]

Em estudos recentes, o *freeze-casting* foi aplicado na elaboração de *scaffolds* híbridos utilizando vidro bioativo funcionalizado com poli(D,L-lactídeo) (PDLLA). O trabalho demonstrou que o controle da temperatura durante o congelamento influencia significativamente a morfologia dos poros, resultando em estruturas lamelares ou tubulares com tamanhos ajustáveis entre 30 e 380 μm e anisotropia otimizada, fundamentais para a colonização celular e a recuperação de propriedades mecânicas após testes de compressão [178]. Outros estudos evidenciam a aplicabilidade do *freeze-casting* na fabricação de materiais com estruturas anisotrópicas a partir de cryogéis baseados em polímeros naturais. Os resultados mostram que essa técnica permite a obtenção de materiais porosos leves e robustos com propriedades térmicas e mecânicas superiores,

facilitando a infiltração de polímeros e a formação de compósitos funcionais [179]. Além disso, no contexto de *scaffolds* cerâmicos, trabalhos anteriores destacam que o *freeze-casting* possibilita uma distribuição uniforme das partículas, evitando a agregação e garantindo uma estrutura homogênea com melhores propriedades mecânicas que reforçam a aplicação na engenharia de tecidos ósseos. A combinação de porosidade controlada e dispersão homogênea de nanopartículas demonstra a versatilidade do método para adaptar as propriedades finais do material às exigências clínicas [180].

Algumas rotas de impregnação já foram descritas na literatura [181], mas envolvem apenas materiais como HAC e os polímeros PVA e PLA. Esse trabalho se diferencia pois propõe a utilização do processo *freeze-casting* para produção de estruturas com potencial para regeneração óssea utilizando água como solvente e a mistura de VB com PVA.

Quando comparada ao *freeze-casting*, a manufatura aditiva apresenta maior controle na morfologia e tamanho dos poros, com variações entre 50 μm e 500 μm em função da técnica e do material utilizado. Suas variações e aplicações serão estudadas adiante.

3.6.2. Manufatura aditiva

Diferente de muitos métodos de manufatura que são subtrativos, como o *freeze-casting*, e envolvem a remoção de material para formar uma peça, a manufatura aditiva cria objetos tridimensionais a partir da adição sucessiva de camadas de material, seguindo um modelo digital predefinido.

A impressão 3D, uma das formas mais difundidas de manufatura aditiva, utiliza diversos tipos de materiais, incluindo polímeros, metais, cerâmicas e compósitos, permitindo sua aplicação em uma vasta gama de indústrias, como aeroespacial, automotiva, médica e de bens de consumo [182]. Entre os processos mais comuns estão a *Fused Deposition Modeling* (FDM), *Selective Laser Sintering* (SLS) e a *Stereolithography* (SLA), cada um deles oferecendo diferentes vantagens em termos de precisão, velocidade de produção e tipo de material utilizável.

O *Fused Deposition Modeling* é um dos processos mais populares e acessíveis de impressão 3D, amplamente utilizado para prototipagem rápida. Nesse processo, um

filamento de material termoplástico, como ABS (Acrilonitrila Butadieno Estireno) ou PLA, é aquecido até atingir seu ponto de fusão e extrudado através de um bico em uma plataforma de construção. O material é depositado camada por camada, seguindo um padrão definido por um modelo digital e à medida que cada camada é depositada, ela se solidifica rapidamente, aderindo à camada anterior até que o objeto completo seja formado. A simplicidade, baixo custo dos materiais e das máquinas, e a capacidade de fabricar peças com uma razoável precisão dimensional tornam o FDM uma escolha popular para protótipos e peças funcionais de uso final [183]. Comparado a técnicas como o SLS e o SLA, o FDM possui a vantagem do baixo custo, facilidade operacional e a disponibilidade de materiais, mas apresenta limitações quanto à resolução (tipicamente de 100–200 μm). Estruturas produzidas de HA e poli(etileno glicol) já foram reportadas na literatura com resistência à compressão na ordem de 2-10 Mpa e de tração de até $67,9 \pm 7,4$ MPa com módulo de Young de $7,9 \pm 3,6$ GPa [184]. A FDM é amplamente utilizada para prototipagem rápida devido à sua acessibilidade e simplicidade, utilizando principalmente termoplásticos como ABS e PLA. Já o SLS e a SLA são preferidos em aplicações que exigem alta precisão e resolução, utilizando pós de polímeros e resinas fotossensíveis, respectivamente [183].

O *Selective Laser Sintering* é um processo de manufatura aditiva que utiliza um laser de alta potência para sinterizar partículas de pó, geralmente de polímeros ou metais, fundindo-as seletivamente para formar uma estrutura sólida. O processo ocorre dentro de uma câmara de construção aquecida, onde uma camada fina de pó é espalhada sobre uma plataforma. O laser é então dirigido a essa camada para fundir seletivamente as áreas designadas pelo modelo digital, criando uma seção transversal do objeto. Após a sinterização de cada camada, a plataforma é abaixada e uma nova camada de pó é aplicada, repetindo o processo até que o objeto seja completado. O SLS permite a fabricação de peças com geometrias complexas e sem necessidade de estruturas de suporte, já que o pó não sinterizado circundante sustenta a peça durante a fabricação. Este processo é conhecido por sua alta precisão e pela capacidade de produzir peças com boas propriedades mecânicas e térmicas [185]. Em comparação ao FDM, o SLS oferece maior precisão dimensional, de até 50 μm . *Scaffolds* produzidos com vidro bioativo 13-93 apresentaram resistência a compressão de 21.4 ± 0.9 MPa [186]

A *Stereolithography* é uma das tecnologias de impressão 3D mais antigas e é conhecida por sua alta precisão e capacidade de produzir detalhes finos. No processo SLA, uma resina líquida fotossensível, geralmente composta de um polímero, é solidificada camada por camada utilizando um feixe de laser ultravioleta. O laser é projetado sobre a superfície da resina, polimerizando a resina nas áreas específicas e formando uma camada sólida. Após a formação de cada camada, a plataforma de construção é abaixada levemente e uma nova camada de resina líquida é espalhada sobre a superfície, repetindo o processo até que a peça esteja completa. O SLA é amplamente utilizado na fabricação de peças que exigem alta precisão dimensional e superfícies lisas, como moldes para fundição, protótipos detalhados e componentes médicos [187]. A principal limitação do SLA é o custo das resinas e a necessidade de pós-processamento para remover os suportes e curar completamente a peça [188]. Na literatura, *scaffolds* com misturas de 1,6-hexanodiol diacrilato, trimetilolpropano triacrilato e β -TCP produzidos por SLA atingiram resistências à compressão de 0.6 a 16.8 MPa para porosidades de 51 e 87 %, respectivamente [189].

Na aplicação biomédica, a impressão 3D tem mostrado um potencial extraordinário na fabricação de próteses personalizadas, implantes e até mesmo estruturas de tecido biocompatíveis, como *scaffolds* para engenharia de tecidos. O uso de materiais como hidroxiapatita, vidros bioativos e polímeros biodegradáveis, em combinação com técnicas avançadas de impressão, permite a criação de estruturas com propriedades mecânicas adequadas e porosidade controlada, essenciais para o crescimento celular e integração com tecidos vivos. Outro fator relevante para o uso da impressão 3D é a possibilidade de personalização, na qual, dispositivos médicos podem ser adaptados às necessidades específicas de cada paciente, aumentando a eficácia e a aceitabilidade dos tratamentos [185].

A bioimpressão 3D também emergiu como uma tecnologia promissora para a engenharia de tecidos ósseos. Esta técnica permite a deposição precisa de células e materiais biocompatíveis em arquiteturas tridimensionais que replicam de forma mais fiel a complexidade do tecido ósseo. A bioimpressão 3D tem o potencial de fabricar enxertos ósseos personalizados que se adaptam perfeitamente ao defeito ósseo do paciente, promovendo uma integração mais rápida e eficiente [42].

4. FREEZE-CASTING DE COMPÓSITOS CERÂMICOS

4.1. INTRODUÇÃO

Em um trabalho recente [76], *scaffolds* de 58S foram preparados por *freeze-casting* para engenharia de tecidos ósseos. Devido à baixa capacidade de sinterização do 58S, foi necessário um tratamento térmico a 1250 °C por 2 horas. Essa alta temperatura resultou na cristalização do 58S, o que comprometeu negativamente seu desempenho biológico. Neste trabalho, foram desenvolvidos *scaffolds* utilizando o processo de *freeze-casting*, combinando os vidros bioativos 13-93 e 58S com o objetivo foi aproveitar a baixa tendência à cristalização do 13-93 e a alta área de superfície e bioatividade do 58S. Além disso, esperava-se que a incorporação do vidro 13-93, conhecido por sua alta resistência mecânica [117], melhorasse as propriedades mecânicas gerais das estruturas compostas. O método de *freeze-casting* foi selecionado devido à sua flexibilidade, viabilidade e escalabilidade [190]. Até onde sabemos, este é o primeiro relato na literatura sobre a fabricação de *scaffolds* compostos de 58S/13-93 usando *freeze-casting*. Para avaliar as propriedades estruturais e o comportamento mecânico das amostras, foram realizados testes de Arquimedes, difração de raios X (DRX), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), adsorção de N₂, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), microtomografia por raios X (micro-CT) e ensaios de compressão. Além disso, o comportamento biológico dos *scaffolds* foi analisado por meio de testes *in vitro*, incluindo imersão em fluido corporal simulado (SBF) e citometria de fluxo. Este estudo representa um avanço significativo na medicina regenerativa, ao introduzir *scaffolds* altamente porosos e mecanicamente robustos, preparados a uma temperatura de sinterização reduzida de 650 °C. Esta inovação oferece vantagens importantes em termos de eficiência energética, custo-benefício e redução do tempo de fabricação, aumentando assim a viabilidade e escalabilidade na produção de *scaffolds* para aplicações em engenharia de tecidos.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Reagentes

Tetraetilortossilicato (TEOS, Aldrich, 98 %), fosfato de trietila (TEP, Aldrich, $\geq 99,8$ %) e nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Aldrich, 99 %) foram utilizados para a preparação do vidro 58S. Para o processamento do vidro 13-93, foram empregados nitrato de sódio (NaNO_3 , Aldrich, 99 %), nitrato de potássio (KNO_3 , Aldrich, ≥ 98 %) e nitrato de magnésio hexa hidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Anidrol, P.A.). Água deionizada Milli-Q ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) e ácido nítrico (HNO_3 , Anidrol, 65 %) foram utilizadas no processamento sol-gel das amostras de vidro. Para a etapa de *freeze-casting*, foram empregados água deionizada, ácido cítrico (CA, Synth, $\geq 99,5$ %) e poli(álcool vinílico) (PVA, $M_w = 9.000-10.000 \text{ g/mol}$, Aldrich, 80 % hidrolisado) como solvente, agente dispersante e ligante, respectivamente.

4.2.2. Processo Sol-Gel - Vidro Bioativo 58S

A metodologia sol-gel descrita por Pereira *et al.* [191] foi utilizada como referência para a síntese do vidro bioativos 58S. H_2O e HNO_3 foram inicialmente misturados sob agitação em temperatura ambiente, mantendo o pH dessa solução próximo a 2. Em seguida, TEOS foi adicionado, e o sistema foi agitado por mais uma hora. A razão molar de TEOS: H_2O foi fixada em 12:1. TEP e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foram adicionados à solução, sendo este último uma hora após o primeiro, e a solução preparada foi então agitada em temperatura ambiente por 60 minutos. A solução sol-gel preparada foi vertida em moldes de politetrafluoretileno (PTFE), vedada, e envelhecida ao ar a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 horas. Os monólitos resultantes foram parcialmente moídos e secos ao ar a uma temperatura máxima de $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por até 5 dias, aumentando em $10 \text{ }^\circ\text{C}$ por dia até que $120 \text{ }^\circ\text{C}$ fossem atingidos. O particulado obtido foi então tratado termicamente ao ar a $700 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas, utilizando uma taxa de aquecimento de $1 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. Finalmente, os materiais sintetizados foram moídos a seco em moinho de bolas por 12 horas como ilustrado na Figura 4.1 [170].

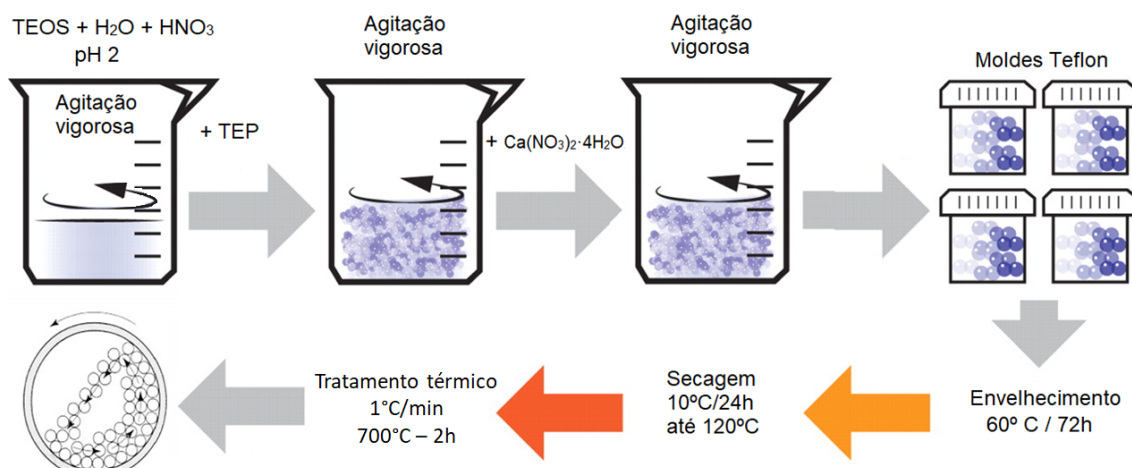


Figura 4.1 – Rota de síntese sol gel do vidro bioativo 58S. Fonte: [170]

4.2.3. Processo Sol-Gel - Vidro Bioativo 13-93

Foi utilizada uma metodologia similar àquela descrita por Deliormanli *et al.* [115] como referência para a síntese do vidro bioativo 13-93. Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa de HNO₃ a 0,3 M em temperatura ambiente. Em seguida, o TEOS foi adicionado, e a solução foi agitada até atingir homogeneidade, mantendo a razão molar de H₂O em 15:1. Após a homogeneização, foram adicionados sequencialmente TEP, NaNO₃, Ca(NO₃)₂·4H₂O, KNO₃ e Mg(NO₃)₂·6H₂O. Cada precursor foi introduzido aproximadamente 30 minutos após o anterior para assegurar a homogeneidade da mistura. Após a adição de KNO₃, o sistema foi aquecido a 60 °C para promover a completa dissolução dos componentes. A solução resultante foi agitada por 2 horas em um frasco fechado para garantir a uniformidade e, em seguida, deixada em temperatura ambiente por 3 dias para permitir a formação do gel. O frasco foi parcialmente aberto, e o gel foi envelhecido a 60 °C por 48 horas antes de ser seco ao ar a 120 °C por 24 horas. Após a secagem, a amostra foi tratada termicamente ao ar a 625 °C por 4 horas, com uma taxa de aquecimento de 1 °C.min⁻¹. Finalmente, a amostra seca foi moída a seco em um moinho de bolas por 12 horas, conforme ilustrado na Figura 4.2 [170].

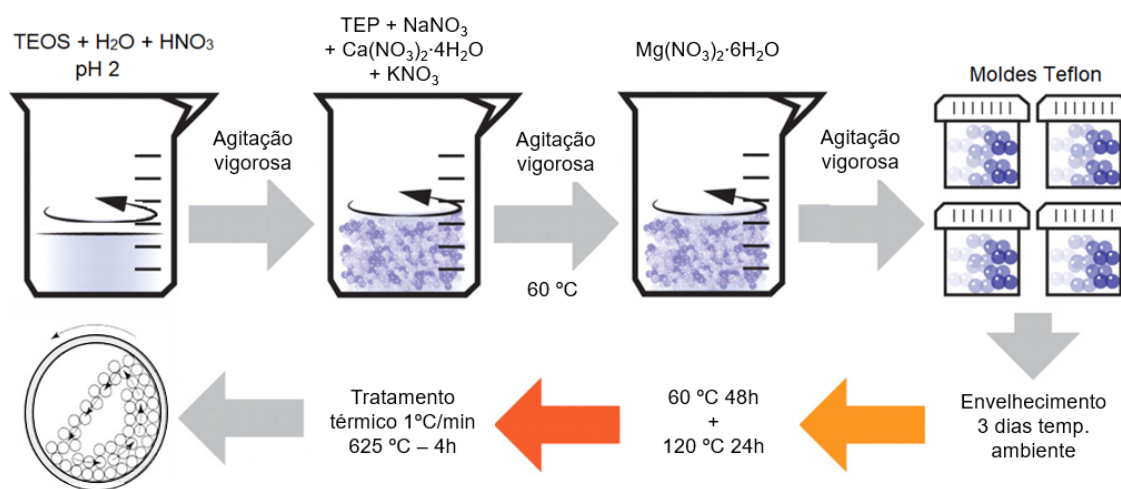


Figura 4.2 – Rota de síntese do vidro bioativo 13-93. Fonte adaptada [170]

4.2.4. Preparação de matrizes porosas via técnica *Freeze-casting*

Partículas de vidro 58S e 13-93 foram dispersas em H₂O com a adição de 1 % em peso de AC como agente dispersante, seguidas de agitação por 1 hora em temperatura ambiente. A proporção em massa de 58S/13-93 foi variada para 30/70, 50/50 ou 70/30, enquanto a carga sólida foi mantida constante em 20 % em volume. Em seguida, 2 % em massa de PVA foi adicionado e agitado por mais uma hora para permitir que o polímero atuasse como ligante e garantisse a integridade estrutural dos corpos verdes nas etapas subsequentes. A suspensão foi sonicada por 10 minutos para remover bolhas de ar e desfazer aglomerados de partículas antes de ser vertida em moldes cilíndricos de PTFE com 10 mm de diâmetro e 30 mm de altura. O congelamento foi realizado usando um dedo frio de cobre em um refrigerador mantido a aproximadamente -19 °C de maneira unidirecional, de baixo para cima. Os corpos verdes resultantes foram então liofilizados à -44 °C e pressão de 10 mbar e posteriormente sinterizados ao ar com uma taxa de aquecimento de 1 °C.min⁻¹. O programa de tratamento térmico incluiu um patamar de 30 minutos a 100 °C para eliminação lenta de água, seguida de outro de 2 horas a 300 °C, para eliminação do ligante e uma manutenção final de 2 horas a 650 °C. Um esquema da rota de processamento usada neste estudo é mostrado na Figura 4.3.

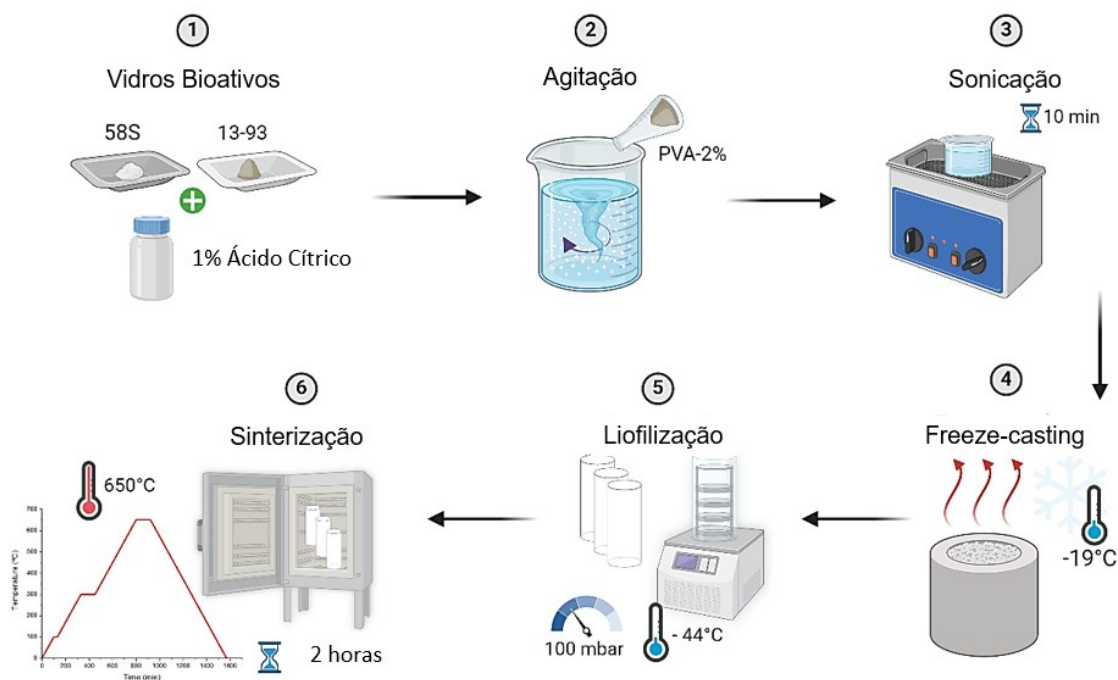


Figura 4.3 – Processo de produção de *scaffolds* cerâmicos de vidros bioativos 58S/13-93 por *freeze-casting*. Fonte própria.

4.2.5. Caracterização estrutural

A densidade real dos materiais foi determinada por meio de picnometria de gás hélio, empregando um Quantachrome MVP-1. As amostras foram maceradas e secas a 100°C antes da análise. A granulometria a laser foi conduzida em um Cilas 1064, com as amostras dispersas em água sem adição de dispersantes. A adsorção de N_2 foi realizada utilizando um Quantachrome Nova 1200e com amostras previamente desgaseificadas a 150°C por 12 horas. A área superficial específica foi calculada pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET), enquanto o tamanho médio de poros foi estimado a partir da relação entre o volume específico de mesoporos e a área superficial específica, utilizando a equação:

$$\bar{d} = \frac{4V_{mes}}{A_{esp}}, \quad \text{Eq. 4.1}$$

onde V_{mes} representa o volume específico de mesoporos ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) e A_{esp} a área superficial específica ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) avaliada pelo método BET.

A análise de DRX foi realizada usando um difratômetro Philips-PANalytical PW 1710, operando a 40 kV e 30 mA, com um tamanho de passo de $0,06^{\circ}$ e utilizando radiação

CuK α . Os picos obtidos nos difratogramas foram comparados com os dados disponíveis na base JCPDS para identificação das fases cristalinas. A análise de FTIR foi realizada em um espectrômetro Bruker Alpha, equipado com acessório ATR (refletância total atenuada) e cristal de diamante. Os espectros foram obtidos com resolução de 4 cm⁻¹ e 128 varreduras, em uma faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, para identificação das ligações químicas presentes nos materiais.

A análise de MEV foi realizada em microscópios Jeol JSM-6360LV e FEI Quanta 200, com tensão de aceleração de 10 kV. As amostras em pó foram dispersas em acetona e sonificadas por 5 minutos antes da deposição em substratos de silício, enquanto os *scaffolds* foram fixados em suportes com fita de carbono dupla face. Antes das análises, as amostras foram revestidas com ouro em uma espessura de 10 nm por pulverização catódica. A análise de EDS foi conduzida com sistemas NORAN acoplados aos microscópios eletrônicos, permitindo a análise da composição elementar das amostras.

As varreduras de micro-CT foram feitas em um Bruker SkyScan 1174, com tensão de 50 kV, corrente de 800 μ A, e um tamanho de pixel aproximado de 14 μ m, permitindo reconstruções tridimensionais precisas da estrutura interna das amostras. O ensaio de Arquimedes foi conduzido utilizando balança Marte AD330 com o objetivo de determinar as frações de poros abertos e fechados nos *scaffolds* fabricados. Inicialmente, a massa do material seco (M_{Seco}) foi registrada. Em seguida, o material foi submerso em água, e o sistema foi submetido a vácuo (160 mm Hg) por até 10 minutos para assegurar o preenchimento completo dos poros com água. Posteriormente, foram medidas a massa do material enquanto submerso na água (M_{Submerso}) e a massa após a remoção do líquido ($M_{\text{Úmido}}$). Com base nesses valores e na densidade verdadeira (ρ), obtida por picnometria de gás hélio, foi possível calcular as frações de poros abertos (P_{Aberta}) e fechados (P_{Fechada}) na amostra, utilizando as Equações 4.2 a 4.5.

$$P_{\text{Aberta}}(\%) = \left(\frac{M_{\text{Úmido}} - M_{\text{Seco}}}{M_{\text{Úmido}} - M_{\text{Submerso}}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 4.2}$$

$$P_{\text{Total}}(\%) = \left(\frac{\rho - B}{\rho} \right) \times 100\% \quad \text{Eq. 4.3}$$

$$B = \left(\frac{M_{\text{Seco}}}{M_{\text{Úmido}} - M_{\text{Submerso}}} \right) \times \rho_{\text{água}} \quad \text{Eq. 4.4}$$

$$P_{\text{Fechada}} = P_{\text{Total}} - P_{\text{Aberta}}, \quad \text{Eq. 4.5}$$

onde P_{Total} representa a porosidade total do material.

A contração das amostras durante o processo de sinterização foi calculada através da variação do volume de cada amostra ($n=8$), com paquímetro Mitutoyo, de resolução 0,01 mm. O diâmetro e altura dos corpos cilíndricos foram três vezes e a média utilizada para cálculo do volume.

Os testes de compressão uniaxial foram realizados utilizando uma máquina Shimadzu AGS-X, com taxa de deslocamento controlada de $0,01 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ e célula de carga de 5 kN, à temperatura ambiente, para avaliar o comportamento mecânico das amostras. Os corpos de prova ($n=8$) foram moldados em cilindros de 1 cm de diâmetro e 2 cm de altura conforme norma ASTM C1424 para corpos de prova cilíndricos.

4.2.6. Bioatividade

A imersão de biomateriais em SBF é uma abordagem padronizada para avaliar a bioatividade de um biomaterial, tornando-a particularmente relevante para aplicações em engenharia de tecidos ósseos [192,193]. Neste estudo, conforme sugerido por Kokubo e Takadama [194], as amostras, em triplicata, foram imersas em SBF a uma concentração de $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por até 14 dias. As amostras foram então lavadas com álcool absoluto e secas ao ar a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas para serem examinadas por MEV, EDS, FTIR e DRX.

4.2.7. Biocompatibilidade

A linhagem celular de fibroblastos MRC5, derivada de tecido pulmonar fetal humano normal, foi utilizada para avaliar a biocompatibilidade das amostras preparadas devido a sua proximidade com a fisiologia humana, além de fibroblastos serem células chaves no processo de colonização de *scaffolds* e regeneração tecidual. Sua alta sensibilidade ao pH e aos íons liberados nos extratos, permite testar biomateriais em situações delicadas por citometria de fluxo.

As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 2 % de solução

antibiótica antifúngica (PSA: penicilina, estreptomicina e anfotericina, Sigma-Aldrich) sob condições controladas (5 % de CO₂, 37 °C e alta umidade). Após atingir a confluência adequada, aproximadamente $1,0 \times 10^8$ células foram transferidas para placas de 12 poços e permitidas a aderir por 24 horas. A avaliação da citotoxicidade foi realizada de acordo com a norma ISO 10993-12 (Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos - Parte 12: Preparação de Amostras e Materiais de Referência) utilizando o método de extrato. Os *scaffolds* foram esterilizados sob luz ultravioleta (UV) por 4 horas e, em seguida, incubados em DMEM (10 g.L⁻¹) por 24 ± 2 horas a 37 ± 1 °C para obter um extrato líquido. O extrato obtido foi aplicado diretamente às células, substituindo o meio sem filtração. Os grupos experimentais (n = 3 por grupo) incluíram: (i) solução de NaCl estéril (0,9 % p/v) como controle negativo, (ii) solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 20 % como controle positivo, e (iii) o extrato líquido dos *scaffolds*.

A citometria de fluxo foi realizada usando o reagente Fixable Viability Stain[®] V450, que diferencia células viáveis de células não viáveis. O reagente exibe uma emissão máxima de fluorocromo a 450 nm e se liga covalentemente às aminas na superfície celular e em locais intracelulares. Como resultado, as células não viáveis apresentam fluorescência aumentada em comparação com as células viáveis em 20.000 eventos por amostra. As células e os controles foram inspecionados visualmente para alterações morfológicas relacionadas à citotoxicidade, incluindo apoptose precoce/tardia, necrose, condensação celular, blebs apoptóticos e desestruturações do citoesqueleto. As imagens foram produzidas em microscópio óptico Nexcope NIB620-FL, campo claro com aumento de 20-40x e corante.

Os resultados obtidos foram expressos pela média \pm erro padrão da média. Os dados foram verificados quanto à normalidade por Shapiro-Wilk seguido de ANOVA e, quando $p < 0,05$ entre grupos, foi aplicado pós teste de Tukey.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Vidros Bioativos

Os vidros bioativos, visualmente são muito semelhantes e incolores antes da secagem, tornando-se brancos e opacos após essa etapa. Na Figura 4.4, é exibida a diferença entre o vidro antes (à esquerda) e após a secagem (à direita). Após a moagem, se tornam um pó branco utilizado nas formulações dos *scaffolds* desse trabalho.

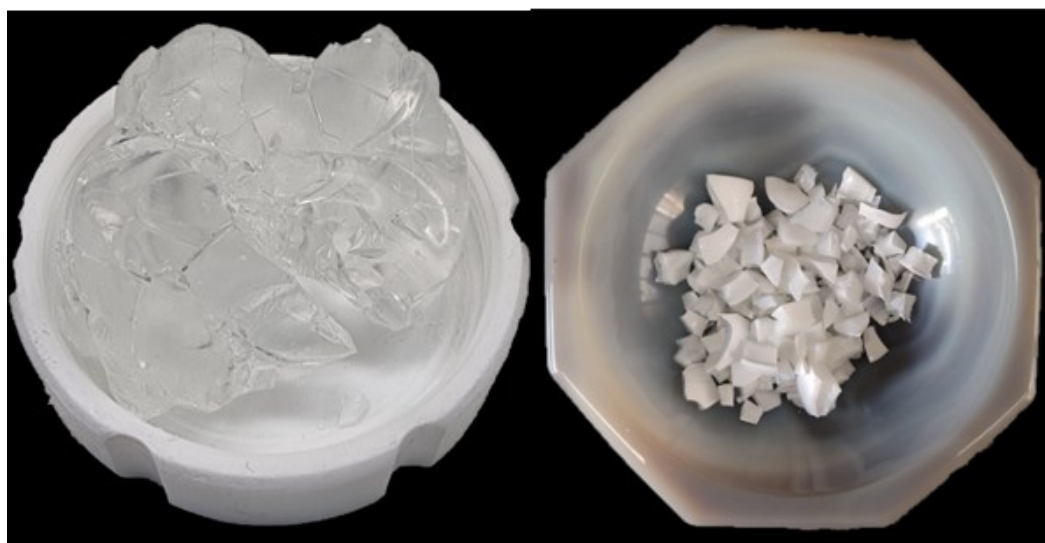


Figura 4.4 – Vidro bioativo antes (esquerda) e depois (à direita) da secagem.

A Figura 4.5 exibe micrografias de MEV obtidas para os vidros 13-93 e 58S. Essas imagens mostram que o vidro 13-93 possui uma distribuição de tamanho de partícula mais fina do que o 58S, como confirmado pela granulometria a laser (tamanho médio de partícula de $7,0 \pm 1,2 \mu\text{m}$ para o 13-93 e $18,4 \pm 2,7 \mu\text{m}$ para o 58S). Além disso, as imagens de MEV mostram partículas com formas irregulares e tamanhos variados, comportamento tipicamente observado em materiais cominuídos mecanicamente. Isso é consistente com o processo de moagem a seco de 12 horas usado após o processo sol-gel. Conforme relatado anteriormente [195], as partículas de 58S têm uma textura porosa, enquanto as partículas de 13-93 têm uma estrutura mais lisa.

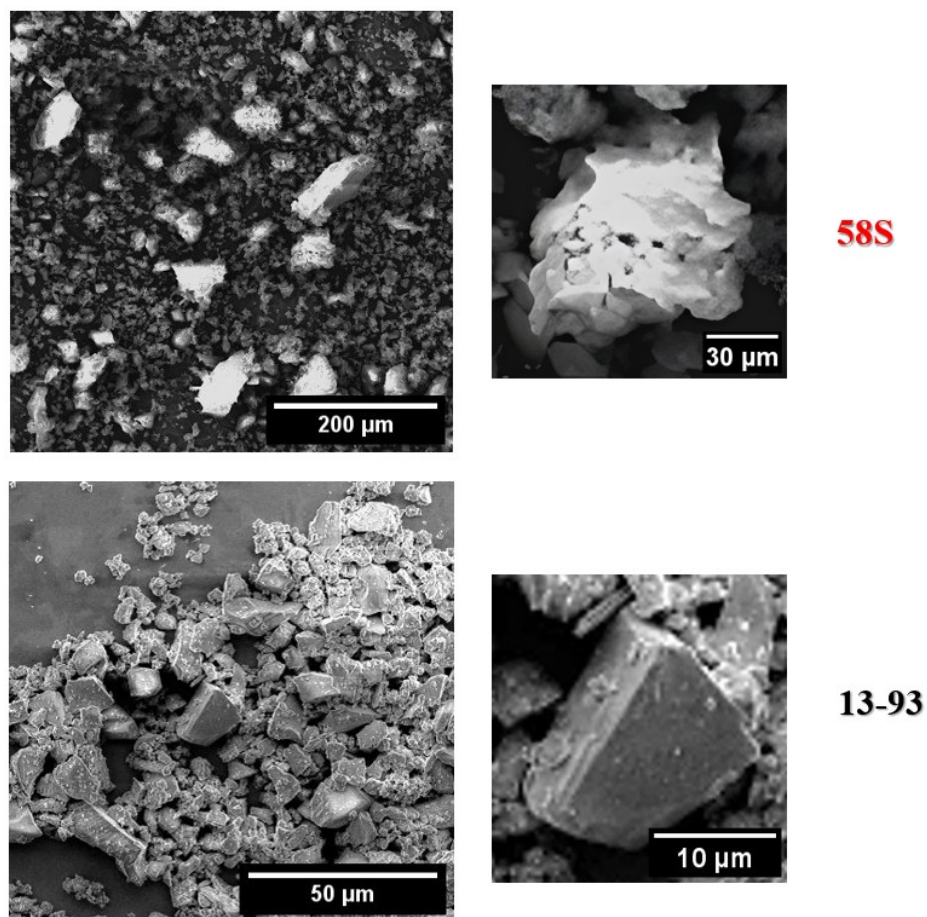


Figura 4.5 – MEV de partículas de vidro bioativo 58S (acima) e 13-93 (abaixo) produzidas por sol-gel.

A Figura 4.6 mostra as isotermas de adsorção de N_2 obtidas para os vidros bioativos 58S e 13-93. Ambas as amostras apresentam um ciclo de histerese, indicando que a condensação capilar de N_2 ocorre dentro dos mesoporos. No entanto, o ciclo é misto, sendo uma histerese mais próxima do tipo IV para o 58S e tipo III para o 13-93. Esse fenômeno indica a presença de meso e macro poros, sendo os últimos menos pronunciados no 58S em comparação com o 13-93, além de sugerir um volume maior de mesoporos no 58S. Esse resultado é consistente com a adsorção de gás significativamente maior observada para o 58S (aproximadamente $300 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) em comparação com o 13-93 (aproximadamente $2,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$).

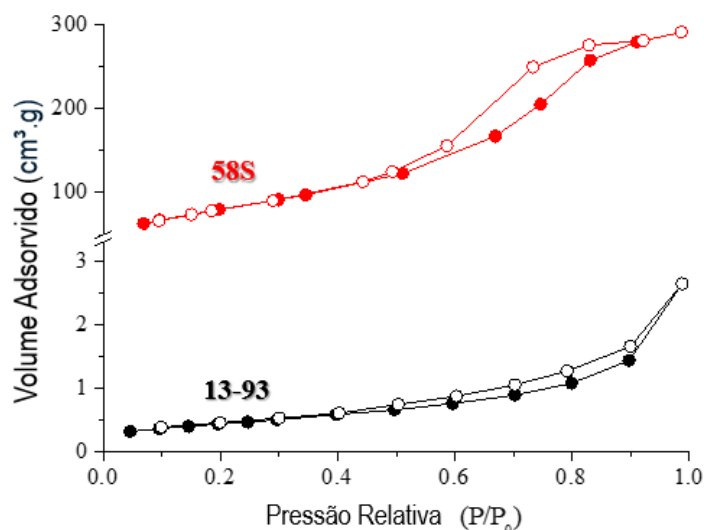


Figura 4.6 – Isotermas de adsorção de N₂ dos vidros 58S e 13-93 tratados termicamente.

A área de superfície específica, avaliada pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET), foi de 280,0 m².g⁻¹ para o 58S e 2,0 m².g⁻¹ para o 13-93. Esses resultados estão em concordância com a literatura, que relata uma área de superfície específica baixa para o vidro 13-93 (3 m².g⁻¹) [118]. Em contraste, o vidro 58S obtido por processamento sol-gel é reconhecido por sua estrutura mesoporosa e elevada área superficial específica (260-290 m².g⁻¹) [195]. Essas propriedades são fundamentais para o seu uso na medicina regenerativa. Os valores de densidade obtidos por picnometria de gás hélio foram de 2,7 g.cm⁻³ para o VB 58S e 2,65 g.cm⁻³ para o VB 13-93.

Os padrões de DRX obtidos para os vidros 13-93 e 58S são mostrados na Figura 4.7. Ambos os materiais apresentam um halo largo centrado em aproximadamente $2\theta = 28^\circ$, o que é característico de materiais amorfos [196]. O padrão de DRX do vidro 58S mostra picos de difração em $2\theta = 32^\circ$ e 42° , que podem ser atribuídos à formação de uma pequena quantidade de wollastonita (CaSiO₃) ou β -TCP dentro da rede vítrea [197]. Durante a síntese do vidro bioativo 13-93, pode ter ocorrido dissolução incompleta ou a formação subsequente de cristais de nitrato, como nitrato de sódio (NaNO₃). Especificamente, os picos de difração em $2\theta = 30^\circ$ já foram reportados na literatura como NaNO₃, enquanto em $2\theta = 35^\circ$ estão presentes tanto o NaNO₃ quanto o β -TCP, e em $2\theta = 45^\circ$, é observado o β -TCP [13].

Os espectros de FTIR obtidos para esses vidros são mostrados na Figura 4.8. As bandas de absorção em 1030 cm^{-1} e 1330 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento assimétrico das ligações Si-O-Si, enquanto a banda em 450 cm^{-1} corresponde ao modo de flexão dessas ligações [198–201]. As bandas em 960 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} estão relacionadas a grupos silanol (Si-OH) [202] e água fisicamente adsorvida [203], respectivamente. A banda em 1425 cm^{-1} é relacionada a grupos CO_3^{2-} [204]. A banda em 820 cm^{-1} corresponde aos modos vibracionais das ligações Si-O-2NBO (oxigênio não-ligante) associadas à presença de modificadores de rede na composição do vidro. A incorporação de íons alcalinos (Na^+ , K^+) e alcalino-terrosos (Ca^{2+} , Mg^{2+}) no vidro bioativo 13-93 enfraquece a estrutura de Si-O, levando à formação de NBOs. Isso desorganiza a estrutura do vidro, resultando em uma menor temperatura de fusão [205,206]. Grupos hidroxila são responsáveis pela ampla banda de absorção centrada em cerca de 3400 cm^{-1} [203].

O padrão de DRX com largo halo, diferença de altura da linha de base e picos de pouca intensidade, indicam baixa cristalização do material e prevalência de estrutura amorfa. A presença das bandas identificadas sugere que houve a formação da rede de sílica, mesmo no vidro 13-93, no qual houve incorporação de precursores com finalidade de diminuir o ponto de fusão. A adição de íons alcalinos distorce a estrutura original do vidro e aumenta a quantidade de oxigênios não ligantes, como já reportado na literatura [207].

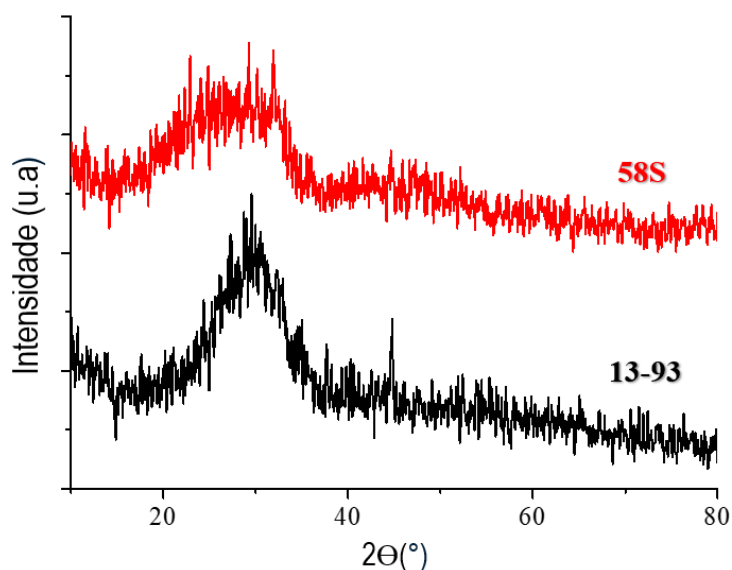


Figura 4.7 – Padrões de DRX dos vidros 58S e 13-93 tratados termicamente

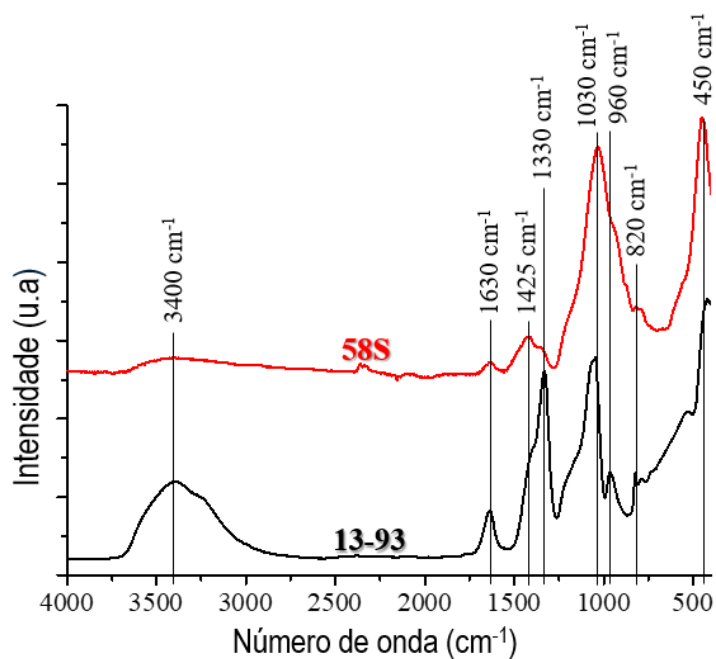


Figura 4.8 - Bandas de absorção em FTIR dos vidros 58S e 13-93

4.3.2. Propriedades estruturais e mecânicas de *Scaffolds*

Os *scaffolds* preparados pelo método *freeze-casting* foram liofilizados e posteriormente sinterizados. Observa-se na Figura 4.9 que o formato cilíndrico se manteve, com leves distorções nos seus diâmetros após tratamento térmico. Essa variação do formato foi mais acentuada em *scaffolds* com maiores teores de vidro 13-93

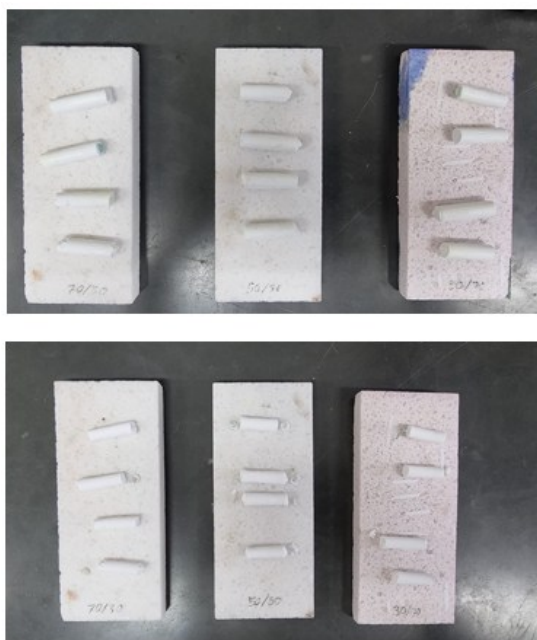


Figura 4.9 - *Scaffolds* cerâmicos produzidos antes (acima) e depois (abaixo) da sinterização, evidenciando manutenção da forma e discreta redução de dimensões.

A Figura 4.10 mostra micrografias de MEV de *scaffolds* produzidos por *freeze-casting* (a) antes e (b) após o tratamento térmico, evidenciando a homogeneidade da estrutura, sem fases distintas em todas as proporções. Como mostrado na Figura 4.10(a), o processo controlado de congelamento unidirecional resulta em poros alinhados que se estendem de baixo para cima. Essa arquitetura de poros lamelares resulta do uso de água nas suspensões iniciais, uma vez que se relata que os cristais de gelo se solidificam nessa morfologia [181,208]. No entanto, após o tratamento térmico, o formato dos poros muda para uma configuração menos orientada e definida (Figura 4.10(b)). Essa mudança é provavelmente devida ao amolecimento da mistura de vidro na temperatura de sinterização, que é próxima à T_g relatada de $660\text{ }^\circ\text{C}$ para o vidro 13-93 [118]. Isso indica que o material sofre fluxo viscoso durante o tratamento térmico, resultando na mudança na estrutura dos poros observada. Em contraste, o 58S tem uma T_g mais alta, de aproximadamente $785\text{ }^\circ\text{C}$ [209]. Isso ressalta a importância crítica de compreender o comportamento térmico dos *scaffolds* de vidro bioativo, a fim de ajustar os parâmetros de processamento e obter as estruturas desejadas para aplicações em engenharia de tecidos ósseos.

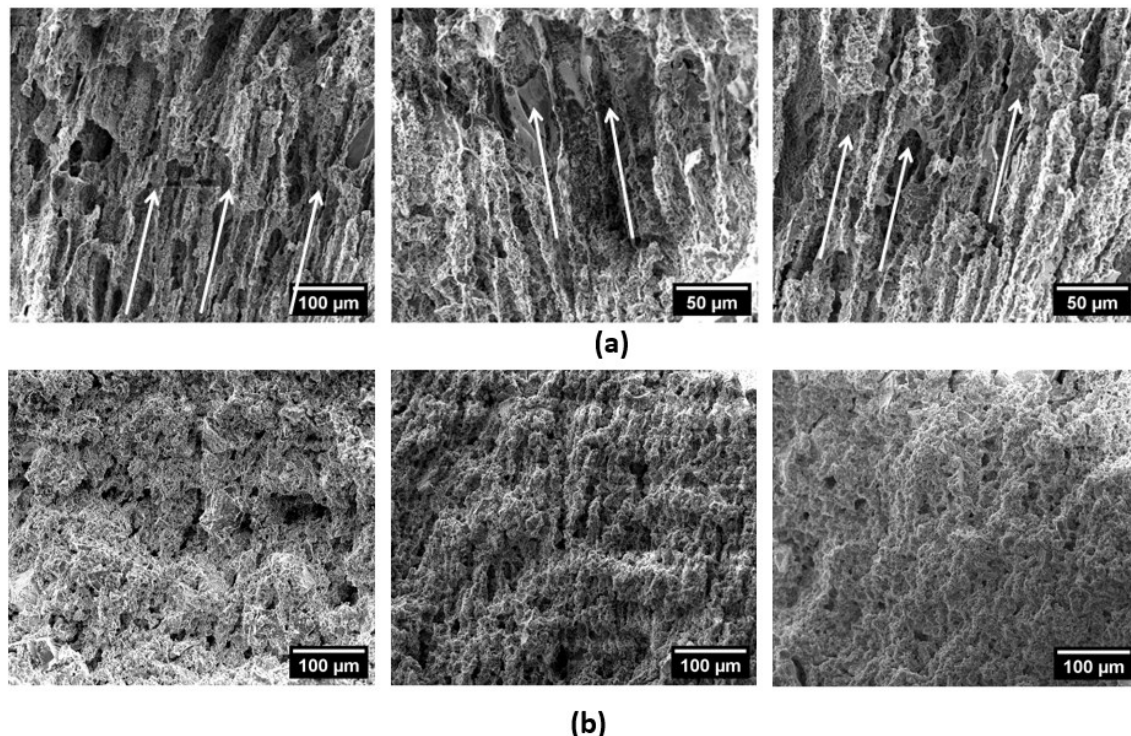


Figura 4.10 – Micrografias de MEV de *scaffolds* por *freeze-casting* (a) antes e (b) depois da sinterização nas proporções 30/70, 50/50 e 70/30 da esquerda para a direita.

Setas brancas indicam a direção dos poros antes do tratamento.

A Figura 4.11(a) ilustra a retração dos *scaffolds* preparados após o processo de sinterização. Embora não tenha sido observada uma diferença significativa no encolhimento ao aumentar a razão de massa 58S/13-93 de 30/70 para 50/50 ($24,3 \pm 2,3$ % vs. $23,7 \pm 1,7$ %), ocorreu uma queda significativa na contração volumétrica para a razão 70/30 ($13,6 \pm 1,1$ %). Assim, verificou-se que quanto maior a carga de 58S nos *scaffolds* preparados, menor é a tendência de retração e encolhimento durante a sinterização. Este resultado destaca a interação complexa das propriedades dos materiais de partida na fabricação de *scaffolds* e demonstra o efeito do ajuste da razão de massa 58S/13-93 na retração dos *scaffolds* durante o processo de sinterização, atribuído ao amolecimento do vidro 13-93. Como mencionado anteriormente, a T_g deste vidro bioativo é relatada em torno de 660 °C [210], o que indica sua suscetibilidade ao amolecimento quando aquecido a 650 °C por 2 horas. Por outro lado, o vidro bioativo 58S possui uma T_g mais alta, de até 785 °C [211], uma indicação de que seu amolecimento durante a sinterização é menos pronunciado.

A Figura 4.11(b) apresenta a avaliação da porosidade aberta, fechada e total para esses materiais pelo método de Arquimedes e a Tabela 4.1 se refere a esses valores calculados por Arquimedes. A redução na retração observada para a amostra 70/30 coincidiu com um aumento na porosidade total, que foi medida em $76,3 \pm 2,6$ %. Em comparação, a porosidade total avaliada para as amostras 30/70 e 50/50 foram de $70,1 \pm 2,4$ % e $73,3 \pm 4,9$ %, respectivamente. Também é notável que a presença de poros fechados nas amostras preparadas seja baixa (menos de 7 %), um comportamento que já foi observado em amostras produzidas por congelamento [210,212]. Poros abertos oferecem vantagens distintas para *scaffolds*, facilitando a integração com o ambiente fisiológico e permitindo a migração de células e vasos sanguíneos. Esta propriedade é crítica para aplicações em engenharia de tecidos, onde a interação contínua entre o *scaffold* e o tecido circundante é essencial para uma regeneração bem-sucedida. Para que um material estimule o crescimento celular, duas características são buscadas: a primeira é uma porosidade aberta acima de, no mínimo, 50% e a segunda são poros com diâmetros iguais ou superiores a 100 μm . Em todas as amostras, a porosidade encontrada foi acima de 70% e o diâmetro de poros foi próximo ao valor de referência quando analisado por Micro-CT, o que torna os *scaffolds* produzidos compatíveis com funções regenerativas e de crescimento celular à luz da porosidade encontrada.

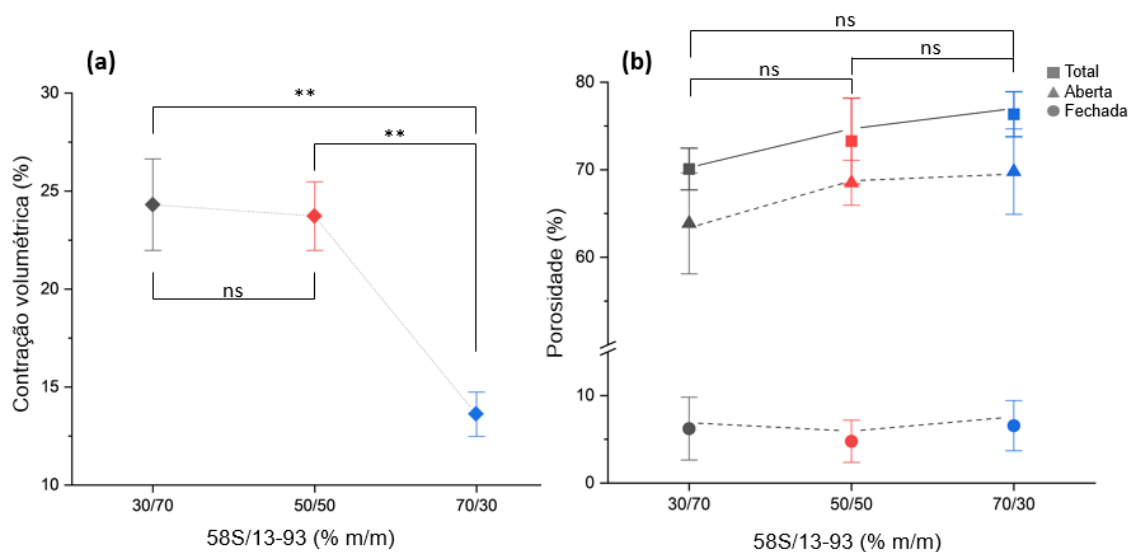


Figura 4.11 – Contração volumétrica observada durante a sinterização (a) e porosidade medida por testes de Arquimedes (b). Significância: $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) e conforme determinado por método One-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey.

Tabela 4.1 – Porosidade aberta, fechada e total dos *scaffolds* mensuradas por testes de Arquimedes. Significância: ns = não significativo, $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) e conforme determinado por método One-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey.

| Amostras | Porosidade fechada (%) | Porosidade aberta (%) | Porosidade total (%) | |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| Scaffolds 58S/13-93 | 30/70 | $6,2 \pm 3,6^{ns}$ | $63,9 \pm 5,8^{ns}$ | $70,1 \pm 2,4^{ns}$ |
| | 50/50 | $4,8 \pm 2,4^{ns}$ | $68,5 \pm 2,6^{ns}$ | $73,3 \pm 4,9^{ns}$ |
| | 70/30 | $6,6 \pm 2,9^{ns}$ | $69,8 \pm 4,9^{ns}$ | $76,3 \pm 2,6^{ns}$ |

A Fig. 4-12(a) exibe imagens típicas de micro-CT obtidas para *scaffold* sinterizado, revelando a presença de poros lamelares dispostos de forma ordenada. Esta estrutura de poros organizada é promissora para otimizar a arquitetura dos *scaffolds* para imitar a complexidade do tecido nativo, aumentando assim a biocompatibilidade e a eficácia terapêutica. Notavelmente, conforme recomendado para aplicações eficazes em enxertos ósseos, todos os *scaffolds* possuem tamanhos médios de poros na faixa de 95-105 μm . Essa faixa de tamanho de poros permite uma infiltração celular adequada, difusão de nutrientes e vascularização, que são críticos para o sucesso na regeneração tecidual [213].

A análise abrangente das propriedades dos *scaffolds* mostrada da Fig. 4.11 até a Fig. 4.12 destaca a intrincada relação entre a composição do material, o comportamento de encolhimento e a estrutura dos poros resultante.

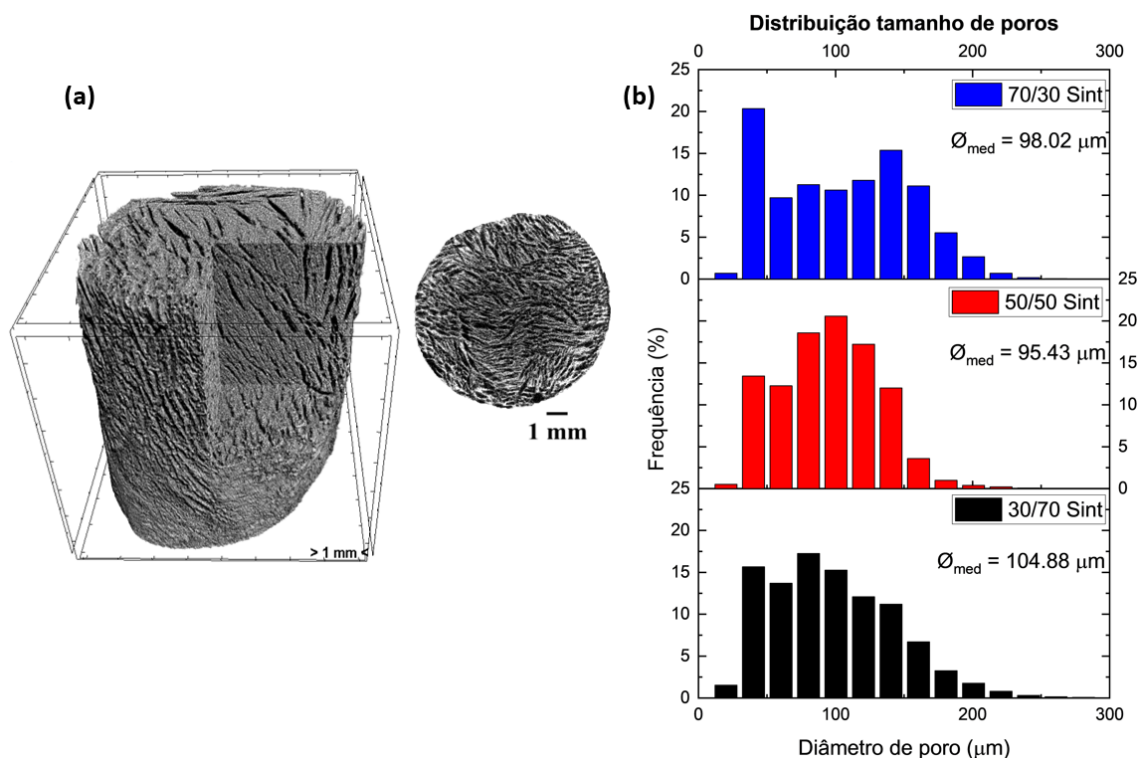


Figura 4.12 - Imagens de micro-CT mostrando a morfologia típica de uma estrutura sinterizada em (a), e distribuições de tamanho de poros determinadas por análise de micro-CT em (b).

A Tabela 4.2 sumariza os valores calculados dos ensaios de compressão dos *scaffolds*. A Fig. 4-11a mostra a resistência à compressão dos *scaffolds* compostos fabricados neste estudo evidenciando variações na resistência à compressão para diferentes razões 58S/13-93.

Tabela 4.2 - Resistência à compressão e Módulo de Young dos *scaffolds* produzidos.

| Amostras | Resistência à compressão (MPa) | Módulo de Young (GPa) |
|---------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Scaffolds 30/70 | 11,3 ± 2,5 | 0,8 ± 0,3 |
| 58S/13-93 50/50 | 4,6 ± 0,5 | 0,4 ± 0,1 |
| 70/30 | 3,8 ± 1,8 | 0,3 ± 0,1 |

Esses resultados revelam uma correlação na qual concentrações mais baixas de 58S e maiores quantidades de 13-93 estão associadas a um aumento na resistência à compressão dos *scaffolds*. Este resultado provavelmente se deve ao fluxo viscoso do vidro 13-93 durante a sinterização, que reduz a porosidade (Fig. 4-9b) e, conseqüentemente, aumenta a resistência mecânica (Fig. 4-13) dos *scaffolds* produzidos. Para referência, *scaffolds* de 58S puros produzidos por *freeze-casting* com aproximadamente 64 % de porosidade, sinterizados a 1250 °C por 2 horas, apresentaram uma resistência à compressão de $1,5 \pm 0,3$ MPa [214]. Além disso, *scaffolds* de vidro 13-93 puro com porosidade semelhante tratados termicamente a 650 °C por 2 horas apresentaram uma resistência à compressão de $22,4 \pm 3,1$ MPa [118].

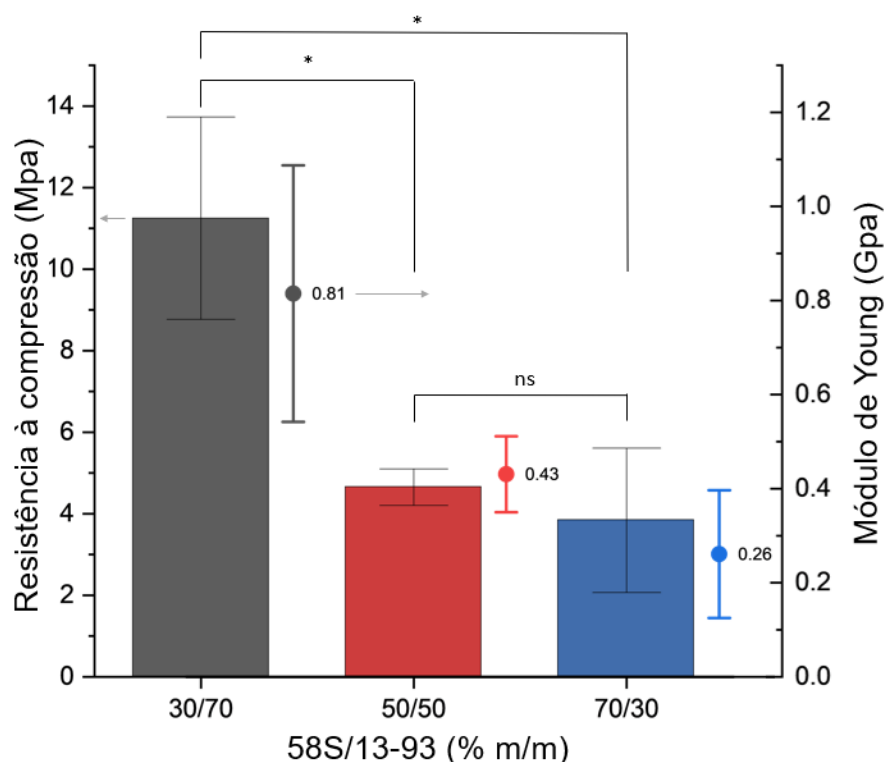


Figura 4.13 - Resistência à compressão e Módulo de Elasticidade

Amostras preparadas com razão de massa 30/70 têm porosidade total de $70,1 \pm 2,4$ %, a menor das amostras devido à influência do fluxo viscoso, e a maior resistência à compressão de $11,3 \pm 2,5$ MPa, e módulo de Young de $0,8 \pm 0,3$ GPa. Essas propriedades tornam este material um candidato promissor para aplicações em engenharia de tecidos ósseos, especialmente para situações de baixa carga que se assemelham ao osso trabecular. Para comparação, o osso cortical pediátrico e adulto geralmente possui

resistências à compressão de aproximadamente 130 MPa e 200 MPa, respectivamente, com módulos de Young de cerca de 12 GPa e 17 GPa [55]. Tomando como referência o osso trabecular do fêmur de um humano adulto, os valores de resistência à compressão estão entre 2,0 a 12,0 MPa e o Módulo de Young 0,01 a 3,0 GPa, a depender da idade e região do corpo [214]. Foi relatado que biomateriais porosos destinados a implantes ósseos devem ter um módulo de Young semelhante ao do osso natural. Isso é importante para reduzir o efeito de “proteção contra tensões” (*stress shielding*), diminuindo o risco de reabsorção óssea e favorecendo a remodelação adequada. Em particular, as propriedades mecânicas do *scaffold* 30/70 são semelhantes às do osso trabecular, aumentando seu potencial uso na medicina regenerativa. Isso aumenta a longevidade do implante, potencialmente eliminando a necessidade de cirurgias futuras para remoção ou substituição, melhorando assim a qualidade de vida do paciente [84,215].

4.3.3. Bioatividade

As Figura 4.14(a) e Figura 4.14(b) mostram o padrão de DRX e os espectros de FTIR de *scaffolds* imersos em SBF por até 14 dias. Os picos de difração destacados na Figura 4.14(a) correspondem a HA em valores de 2θ iguais a $25,9^\circ$ (101), $31,8^\circ$ (002), $32,2^\circ$ (211), $44,9^\circ$ (310) e $46,7^\circ$ (222) demonstram que todas as composições são bioativas em até 3 dias, identificada por referência ao banco de dados JCPDS N° 09-0432. Proporções com maior conteúdo de 58S apresentaram uma taxa mais rápida na formação da camada de HA, sendo detectada já nas primeiras 24 horas na proporção mais alta, amostra 70/30, e em até 72 horas nas demais amostras, conforme já descrito na literatura [84,215]. Na Figura 4.14(b), os espectros de FTIR possui bandas de absorções que também indicam a presença de HAp. Em particular, as bandas em 1020 cm^{-1} , 600 cm^{-1} e 560 cm^{-1} são atribuídas aos grupos PO_4^{3-} da HA [216].

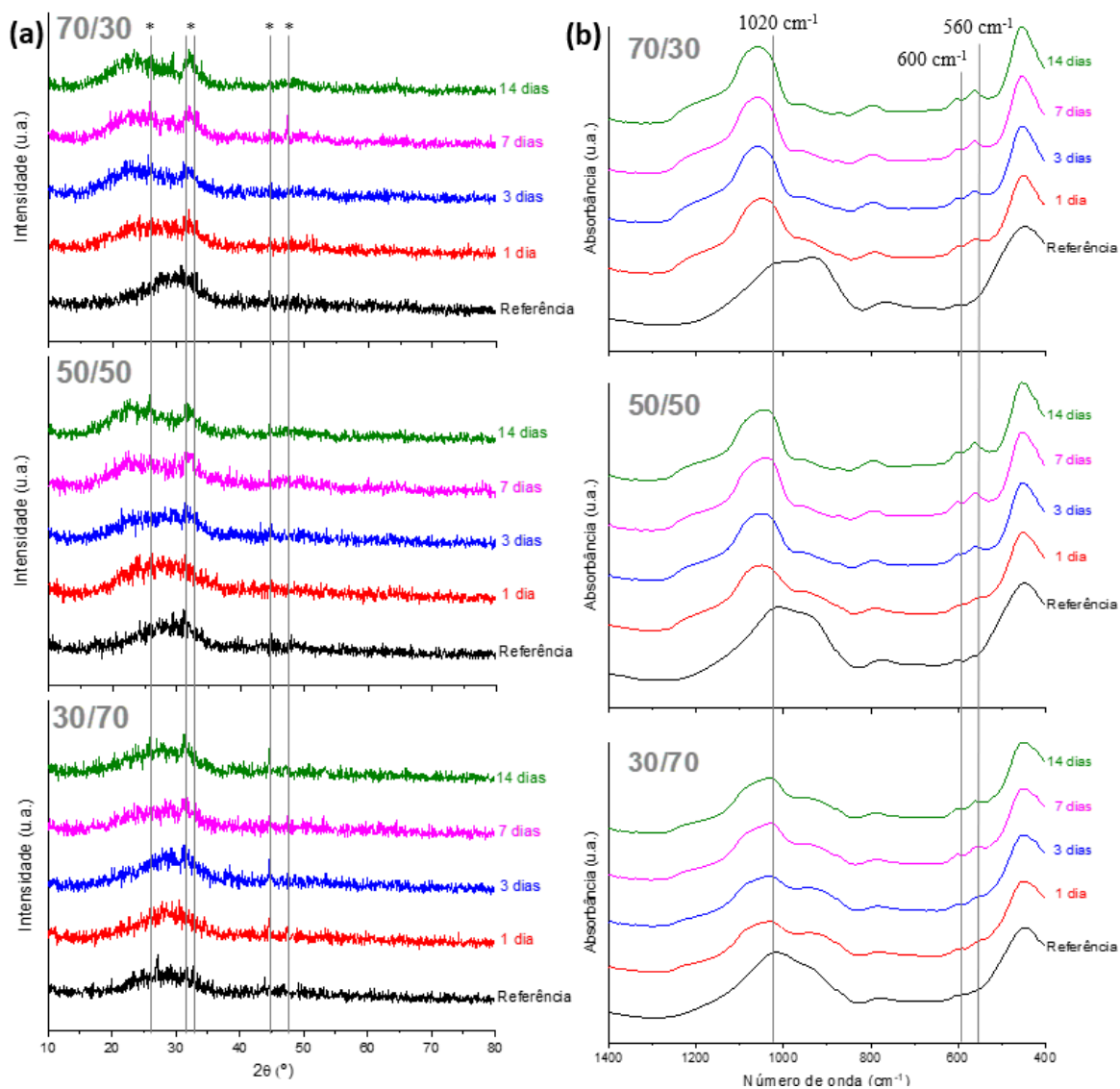


Figura 4.14 - Padrões de DRX (a) e espectros de FTIR (b) obtidos para amostras imersas em SBF por até 14 dias.

As micrografias de MEV na Figura 4.15 ilustram *scaffolds* preparados com razões de massa de 58S/13-93 de 30/70, 50/50 e 70/30 após três dias de imersão em SBF. Pode-se observar nódulos característicos de cristais de HAp em todas as mostras. O aparecimento de cristais de HAp é mais pronunciado com o aumento das quantidades de 58S nas amostras. Por exemplo, os *scaffolds* 70/30 revelaram a formação de HAp dentro do primeiro dia de imersão em SBF (avaliado por DRX e FTIR), mais rapidamente do que os *scaffolds* de 13-93 puros relatados em outros estudos [217]. Essa tendência pode ser atribuída à área de superfície específica significativamente maior do 58S em comparação com o 13-93, que foi medida em aproximadamente $280 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e $2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente

(Fig. 2). A maior área de superfície do 58S permite uma maior interação com o ambiente fisiológico, acelerando assim a formação de HAp.

Ainda na Figura 4.15, verifica-se a análise de EDS, com razões molares de Ca/P calculados na Tabela 4.3, que corrobora com a hipótese de as estruturas observadas serem de HAp, o que é importante para avaliar a bioatividade do *scaffold*. Idealmente, o HAp está associado a uma razão Ca/P de 1,67, que se assemelha de perto à fase mineral do osso humano e, portanto, é bem adequado para a formação de camadas bioativas. A análise das estruturas revelou proporções próximas a esse valor para as amostras 50/50 e 70/30, sendo respectivamente 1,68 e 1,39. A análise de EDS possui um volume de interação que penetra um volume superfície, o que torna possível que além do recobrimento, frações de vidro componham os valores encontrados. Conduziu-se a análise de EDS tanto para a região específica onde se encontravam as estruturas no formato *cauliflower like* e sobre a região do vidro como um todo (região mais ampla, abarcando superfícies cobertas e não recobertas). Como os vidros bioativos possuem razões Ca/P superiores à HA, e o vidro 13-93 contribui mais lentamente para a formação da camada de recobrimento, em amostras com maiores teores desse vidro, a razão Ca/P foi mais elevada. O não recobrimento total da superfície expõe a superfície dos vidros que são analisadas por EDS.

Tabela 4.3 - Valores do espectro EDS da superfície geral do *scaffold* e da estrutura de HA, com a razão molar Ca/P.

| | <i>Scaffold</i> | Ca (molar %) | P (molar %) | Proporção Ca/P |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|-------------------|
| Superfície do <i>Scaffold</i> | 30/70 | 11,54 | 3,20 | 3,61 |
| | 50/50 | 8,20 | 3,33 | 2,46 |
| | 70/30 | 23,65 | 11,11 | 2,13 |
| Estrutura HA | 30/70 | 12,41 | 4,37 | 2,84 |
| | 50/50 | 4,73 | 2,81 | 1,68 |
| | 70/30 | 10,23 | 7,38 | 1,39 |

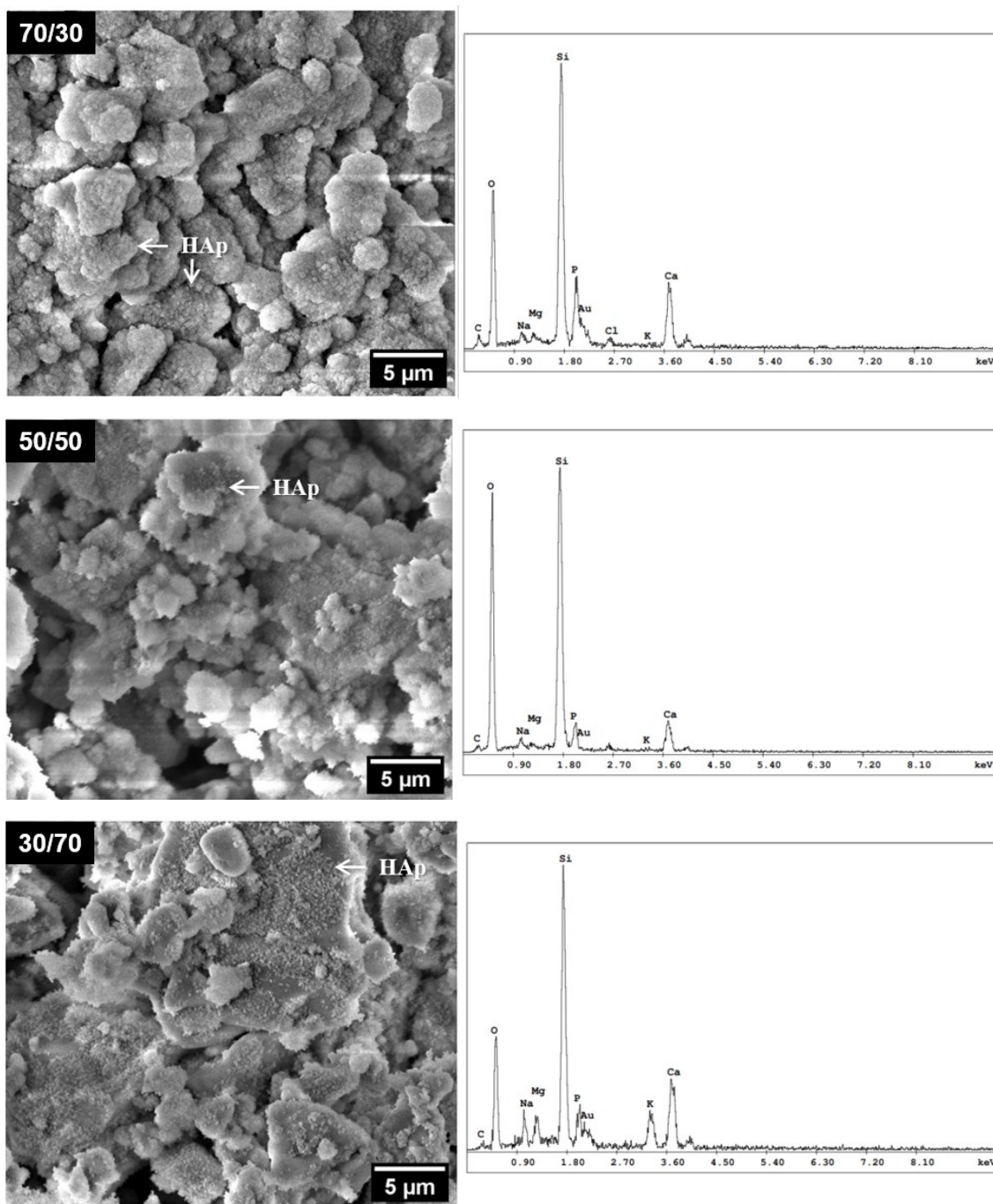


Figura 4.15 - Micrografias de MEV (à esquerda) e seus respectivos espectros de EDS (à direita) obtidos para *scaffolds* imersos em SBF por 3 dias.

4.3.4. Biocompatibilidade

Neste estudo, a biocompatibilidade dos *scaffolds* preparados por *freeze-casting* foi avaliada por citometria de fluxo. A Figura 4.16 fornece painéis detalhados de dot plot para os grupos controle negativo e positivo. O FSC indica o tamanho das células, enquanto o SSC indica a complexidade interna ou granularidade celular. O eixo 7-AAD

representa a intensidade da fluorescência deste corante, que se liga ao DNA das células mortas. Células com alta fluorescência no eixo x são consideradas mortas, pois o 7-AAD só pode infiltrar-se em células com membranas comprometidas. Não há um ponto de corte universal para SSC-A para definir células vivas ou mortas, pois isso pode variar dependendo do tipo de célula e do experimento específico, no entanto, o SSC-A ajuda a distinguir entre diferentes tipos de células e sua complexidade interna. No gráfico fornecido, a granularidade parece ser menos crítica para distinguir entre células vivas e mortas, pois ambos os tipos estão distribuídos em toda a faixa de SSC-A.

A Figura 4.17 mostra dados para células tratadas com o extrato dos *scaffolds* que exibe uma população bem definida de células saudáveis e detritos celulares normais, com altos valores para ambos os parâmetros. O gráfico de dispersão SSC vs. FSC nesta figura mostra um padrão semelhante ao observado na amostra controle negativo (Fig. 4.16), confirmando o comportamento biocompatível da amostra testada. Além disso, o gráfico de dispersão SSC vs. 7-AAD na Fig. 4.17 também sustenta o perfil de biocompatibilidade, mostrando uma pequena população de células mortas semelhante ao controle negativo.

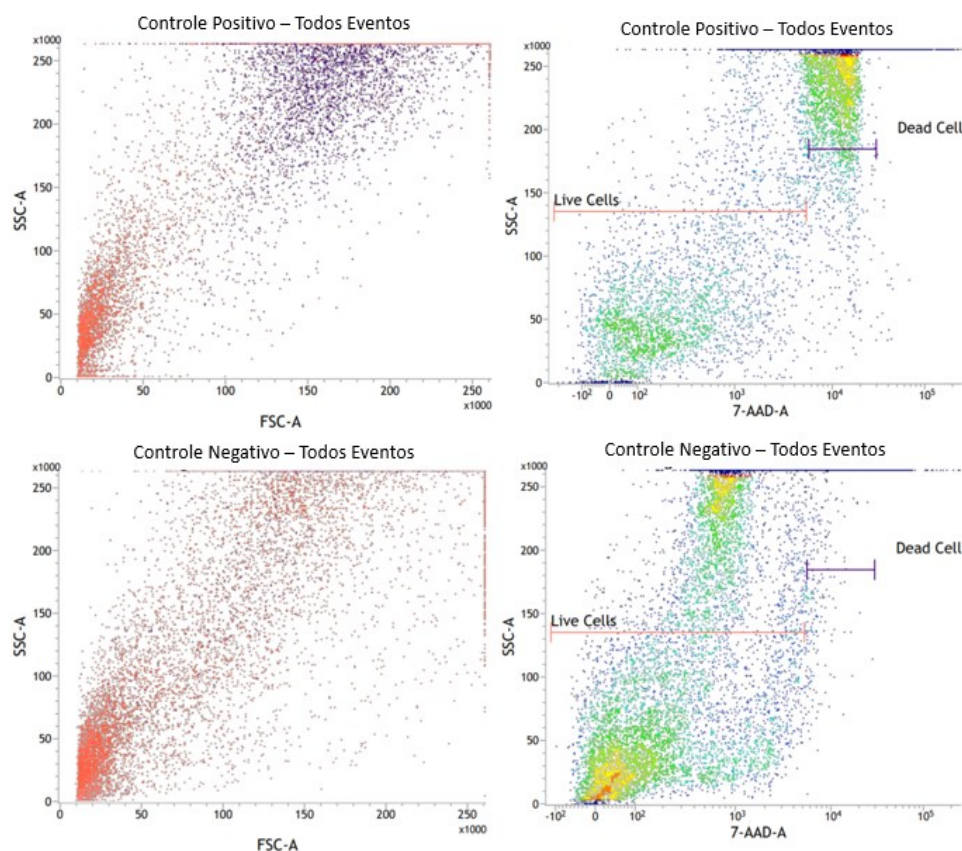


Figura 4.16 - Painéis de citometria de fluxo obtidos neste estudo para grupos controle.

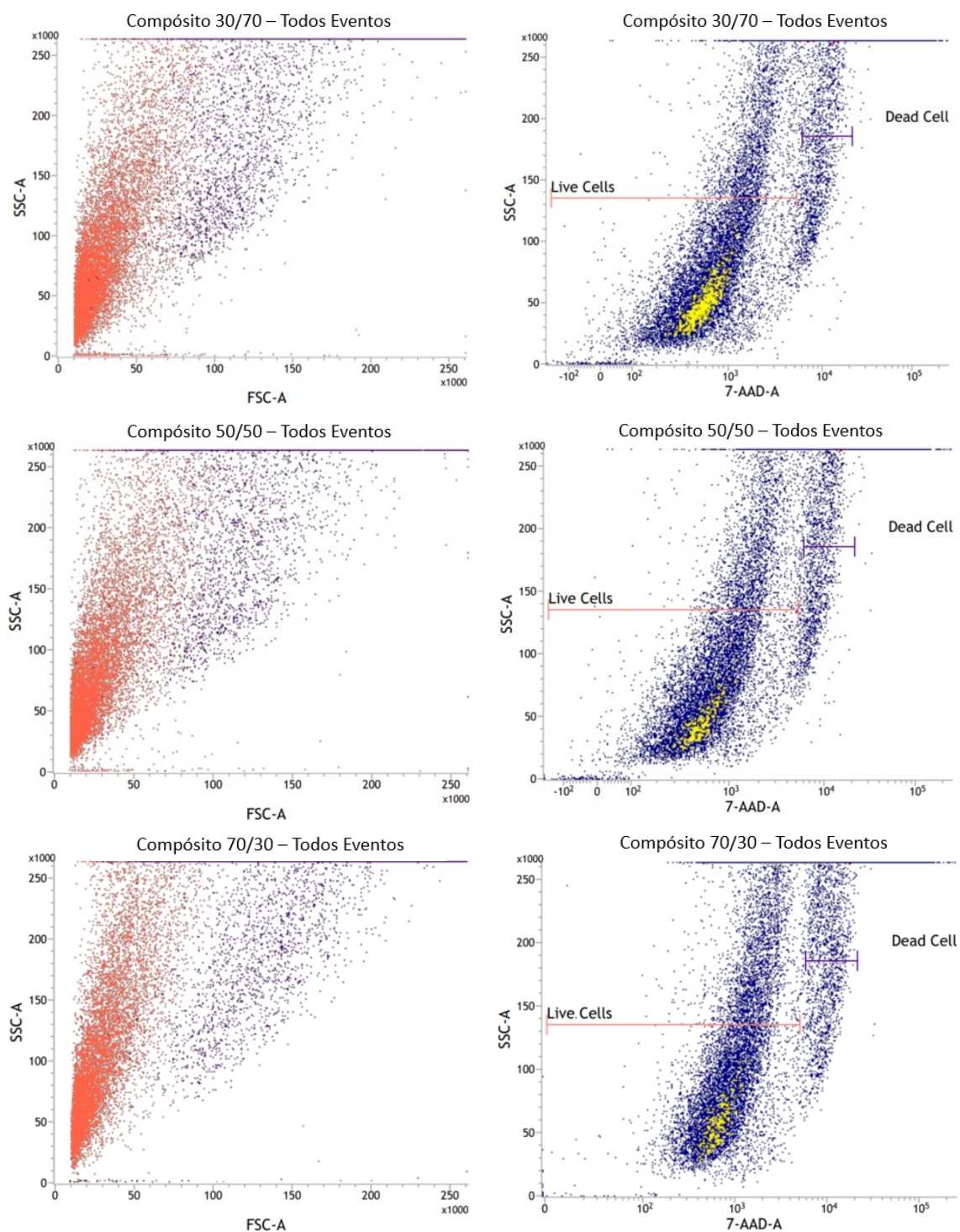


Figura 4.17 - Painéis de citometria de fluxo obtidos neste estudo para cultivo de MRC-5 em extratos dos *scaffolds* produzidos.

As proporções de células vivas e mortas foram determinadas, juntamente com grupos controle positivo e negativo, e os resultados estão resumidos na Tabela 4.4. O percentual de células vivas foi normalizado tendo como limite superior o percentual do controle negativo, Letras diferentes indicam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Os dados

indicaram que os *scaffolds* exibiram baixa citotoxicidade, com viabilidade celular relativa superior a 80 % em todos os extratos de amostras testados, sendo que pela ISO 10993-5 (*Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity*), valores acima de 70% já são considerados não citotóxicos. Esses resultados estão alinhados com o comportamento dos vidros 58S e 13-93 em testes de citotoxicidade de cultivos celulares [111,218].

Tabela 4.4 – Viabilidade celular de células MRC-5 para cada um dos *scaffolds* compósitos preparados avaliada por citometria de fluxo.

| | Amostra | Viabilidade celular (%) |
|-----------------------|------------|-------------------------|
| Grupo controle | Controle - | 88,5 ± 0,2 ^a |
| | 30/70 | 88,1 ± 0,3 ^a |
| Compósitos | 50/50 | 83,1 ± 0,3 ^b |
| | 70/30 | 83,6 ± 0,3 ^b |

A caracterização morfológica das células está disponível na Figura 4.18. As imagens exibem culturas confluentes caracterizadas por alta densidade celular e culturas uniformemente distribuídas, indicando crescimento saudável e viabilidade. Essas observações estão de acordo com os dados de citometria de fluxo. Além disso, a morfologia alongada e em forma de fuso das células tratadas também indica proliferação celular ativa, e não foram observados sinais significativos de citotoxicidade, como arredondamento celular, descolamento ou detritos, indicando que os materiais testados não induziram efeitos citotóxicos significativos nas condições utilizadas [219]. A alta confluência sem descolamento celular significativo sugere que as células estão bem aderidas e experimentando estresse citotóxico mínimo.

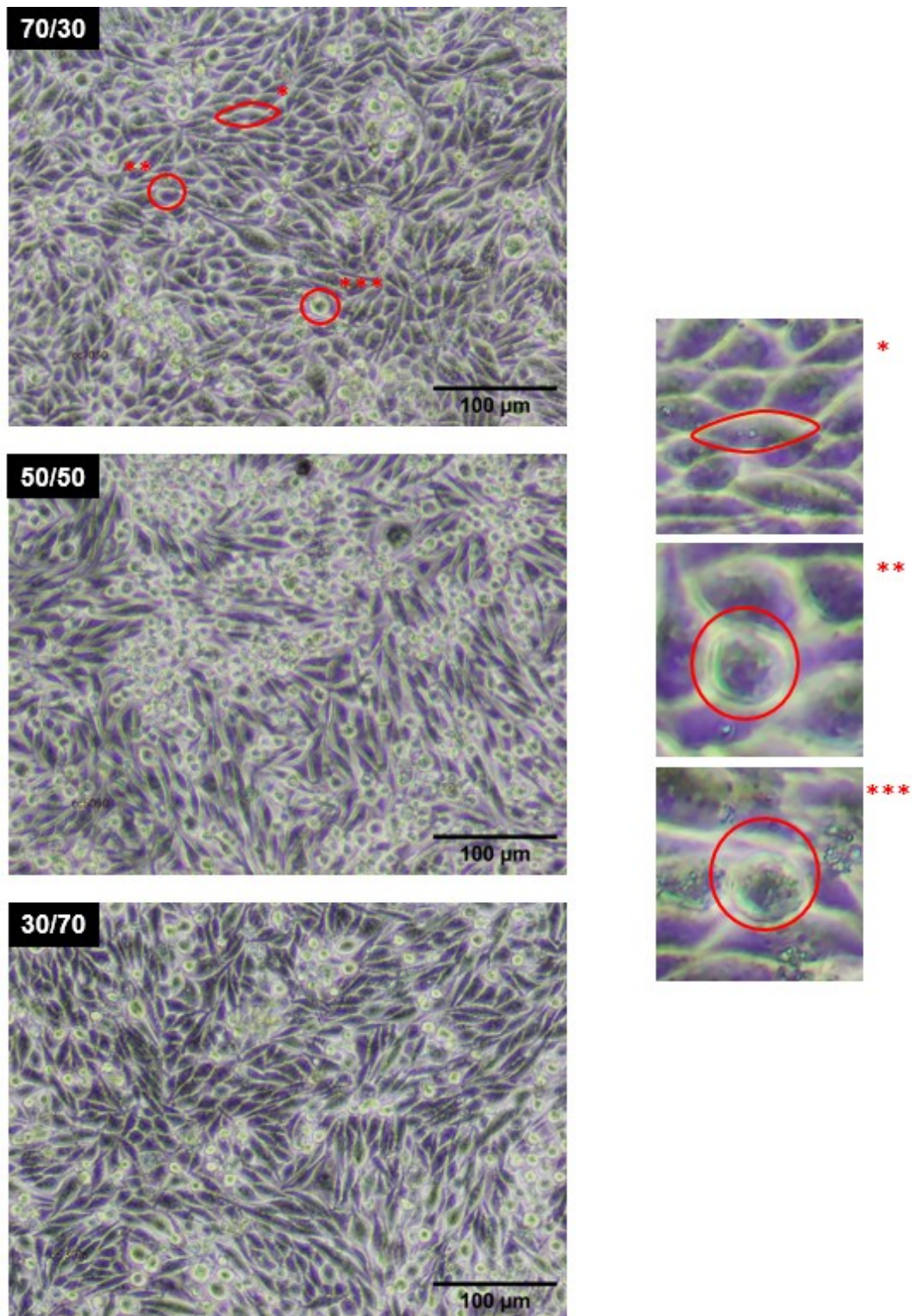


Figura 4.18 - Fotomicrografia de células MRC-5 cultivadas em extratos de *scaffolds* compostos. *Célula saudável fusiforme **Célula arredondada aderida ao substrato ***Célula arredondada desprendida.

4.4. CONCLUSÃO PARCIAL

O principal objetivo deste estudo foi fabricar *scaffolds* utilizando os vidros bioativos 58S e 13-93 por meio da técnica de *freeze-casting* e investigar os efeitos de diferentes proporções de vidro nas propriedades resultantes.

As partículas de vidro 58S e 13-93 foram produzidas pelo método sol gel e apresentaram estrutura predominantemente amorfa, área superficial de $280,0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e $2,0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, além de ligações químicas comumente encontradas em análises da rede destes vidros, conforme já descrito na literatura.

Quanto aos *scaffolds* e seus processamentos, todas as composições com 20% de volume de sólidos propostas foram produzidas com sucesso pelo método *freeze-casting*. as avaliações de porosidade usando o princípio de Arquimedes, exame por MEV e análise por micro-CT indicaram consistentemente que as porosidades acima de 70 % eram adequadas para aplicações em medicina regenerativa, que estipula um mínimo de 50% de porosidade para ser considerado com potencial regenerativo. Em particular, o *scaffold* com uma proporção de massa de 58S/13-93 de 30/70 apresentou a menor porosidade ($70,1 \pm 2,4 \%$), junto com maior resistência à compressão ($11,3 \pm 2,5 \text{ MPa}$) e módulo de Young ($0,8 \pm 0,3 \text{ GPa}$), adequada faixa de valores para evitar *stress shielding* e suportar cargas para aplicações em tecido trabecular.

A sinterização a $650 \text{ }^\circ\text{C}$ removeu efetivamente os compostos orgânicos, preservando a estrutura amorfa de ambos os vidros, confirmado pelos padrões de DRX pós-sinterização, que não mostraram evidências de cristalização. O processo térmico foi efetivo para alcançar o fluxo viscoso e aglomerar as partículas de vidro durante a sinterização e assim, aumentar a resistência mecânica dos *scaffolds* quando comparados ao vidro 58S puro.

Todos os *scaffolds* demonstraram atividade biológica, evidenciada pela formação de cristais de HAp após imersão em SBF em até 3 dias. Os *scaffolds* com maior conteúdo de 58S exibiram bioatividade mais rapidamente, formando camada de HA em até 24 horas. Nenhum *scaffold* apresentou comportamento citotóxico em ensaios de citometria de fluxo, com viabilidades celulares acima de 80 %. Os painéis de citometria de fluxo

confirmaram que os extratos dos *scaffolds* são um método confiável para avaliar a citotoxicidade; no entanto, ensaios de contato direto poderiam fornecer interações mais detalhadas entre as células MRC-5 e os vidros bioativos.

Este estudo demonstra a eficácia da combinação de vidros bioativos 58S e 13-93 para criar *scaffolds* bioativos amorfos com propriedades físicas e respostas biológicas compatíveis com materiais para regeneração óssea trabecular. A utilização do vidro 13-93 possibilita o processamento em temperaturas de sinterização relativamente baixas de 650 °C quando comparadas ao vidro 58S puro, 1250 °C. Tal abordagem oferece vantagens em termos de eficiência energética, redução do tempo de processamento e custo-benefício geral.

5. *FREEZE-CASTING* DE COMPÓSITOS CERÂMICO-POLIMÉRICOS

5.1. INTRODUÇÃO

As propriedades mecânicas do osso resultam da interação entre a hidroxiapatita (HAp), que proporciona rigidez, e as fibras de colágeno, que conferem elasticidade [220,221]. Para mimetizar efetivamente o osso, os enxertos devem replicar essa combinação de propriedades, podendo ser feita através da união de materiais como vidros bioativos e polímeros. Vidros bioativos são amplamente utilizados em enxertos ósseos devido à sua capacidade de se ligar quimicamente tanto a tecidos duros quanto moles com mínima resposta inflamatória [222]. Em particular, o vidro bioativo 58S, com uma composição molar de 60 % de SiO₂, 36 % de CaO e 4 % de P₂O₅, tem atraído ampla atenção por suas propriedades otimizadas, incluindo área de superfície específica e bioatividade [212,223,224]. Polímeros como o PVA são amplamente utilizados em aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade, solubilidade em água, facilidade de processamento e natureza hidrofílica [225–227]. Essas propriedades fazem do PVA um material versátil para matrizes à base de água em compósitos, melhorando suas propriedades funcionais, como bioatividade, ductilidade e tenacidade.

Neste trabalho, *scaffolds* produzidos por *freeze-casting* foram preparados utilizando partículas de vidro 58S derivadas de sol-gel e pellets de PVA como materiais de partida. A água foi utilizada como meio dispersante, e o passo de congelamento foi realizado em um refrigerador doméstico ajustado a -19°C. Os materiais preparados foram caracterizados por difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) e testes de Arquimedes. Ensaio *in vitro* foram realizados utilizando citometria de fluxo e testes de imersão em fluido corporal simulado (SBF). Notavelmente, este trabalho não utilizou uma etapa de sinterização para os *scaffolds*, resultando em economias de energia e tempo. Além disso, evitar a sinterização ajuda a manter a área de superfície e a evitar a cristalização do vidro bioativo, preservando assim sua biocompatibilidade [212]. Este estudo avança no desenvolvimento de *scaffolds* compostos inovadores produzidos por *freeze-casting* para a engenharia de tecidos ósseos. Ao introduzir uma abordagem nova para a fabricação de

scaffolds, faz uma contribuição significativa para o campo em expansão dos biomateriais e da medicina regenerativa, potencialmente levando a tratamentos mais confiáveis e eficientes para defeitos e lesões ósseas.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados neste estudo: água deionizada Milli-Q® (18,2 MΩ a 25 °C), tetraetilortosilicato (TEOS, Aldrich, 98 %), fosfato de trietila (TEP, Aldrich, ≥ 99,8 %), nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), ácido nítrico (HNO_3 , Anidrol, 65 %), pellets de PVA (Aldrich, $M_w = 146.000\text{-}186.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 99 % hidrolisado) e ácido cítrico (CA, Synth, ≥ 99,5 %).

5.2.2. Síntese sol-gel do Vidro 58S

A síntese sol-gel do vidro bioativo 58S seguiu o procedimento descrito por Pereira et al. [228]. Resumidamente, HNO_3 foi inicialmente adicionado à H_2O sob agitação em temperatura ambiente até que o pH da solução atingisse um valor de 2. Em seguida, TEOS foi adicionado, e a razão molar de H_2O foi ajustada para 12:1. A solução sol-gel preparada foi agitada por 1 hora, vertida em moldes de politetrafluoretileno (PTFE) e lacrada. Os moldes foram envelhecidos ao ar a 60 °C por 72 horas e os monólitos obtidos foram posteriormente moídos em um almofariz de ágata e secos ao ar a 60 °C por 24 horas. A temperatura do forno foi gradualmente aumentada para 120 °C, com um aumento diário de 10 °C. As partículas de vidro foram então tratadas termicamente ao ar a 700 °C por 2 horas, com uma taxa de aquecimento de 1 °C.min⁻¹. Finalmente, os materiais resultantes foram moídos em moinho de bolas por 12 horas para quebrar aglomerados de partículas como mostrado na Figura 4.1.

5.2.3. Freeze-casting

As partículas de vidro 58S foram inicialmente dispersas em água a uma concentração de 20 % em volume por 1 hora em temperatura ambiente, com a adição de 1 % em massa de CA como agente dispersante. Enquanto isso, pellets de PVA foram adicionados à água quente (80 °C) e agitados vigorosamente por 1 hora. A suspensão de 58S e a solução de PVA foram então misturadas em temperatura ambiente e agitadas por 1 hora. A razão de carga de 58S para PVA foi ajustada para 80/20, 90/10 ou 95/5, mantendo o volume máximo de sólidos da solução final em 20%. As suspensões resultantes foram então sonicadas por 10 minutos para eliminar bolhas de ar e dispersar quaisquer aglomerados de partículas. Em seguida, foram vertidas em moldes cilíndricos de PTFE com 10 mm de diâmetro e 30 mm de altura. Esses moldes foram colocados sobre um dedo frio de cobre e deixados para congelar em um refrigerador doméstico mantido a -19 °C. Após a remoção dos moldes, as amostras congeladas foram liofilizadas a aproximadamente -40 °C e 100 mbar por 24 horas. A Figura 5.1 mostra um esquema do processo de preparação dos *scaffolds* por *freeze-casting*.

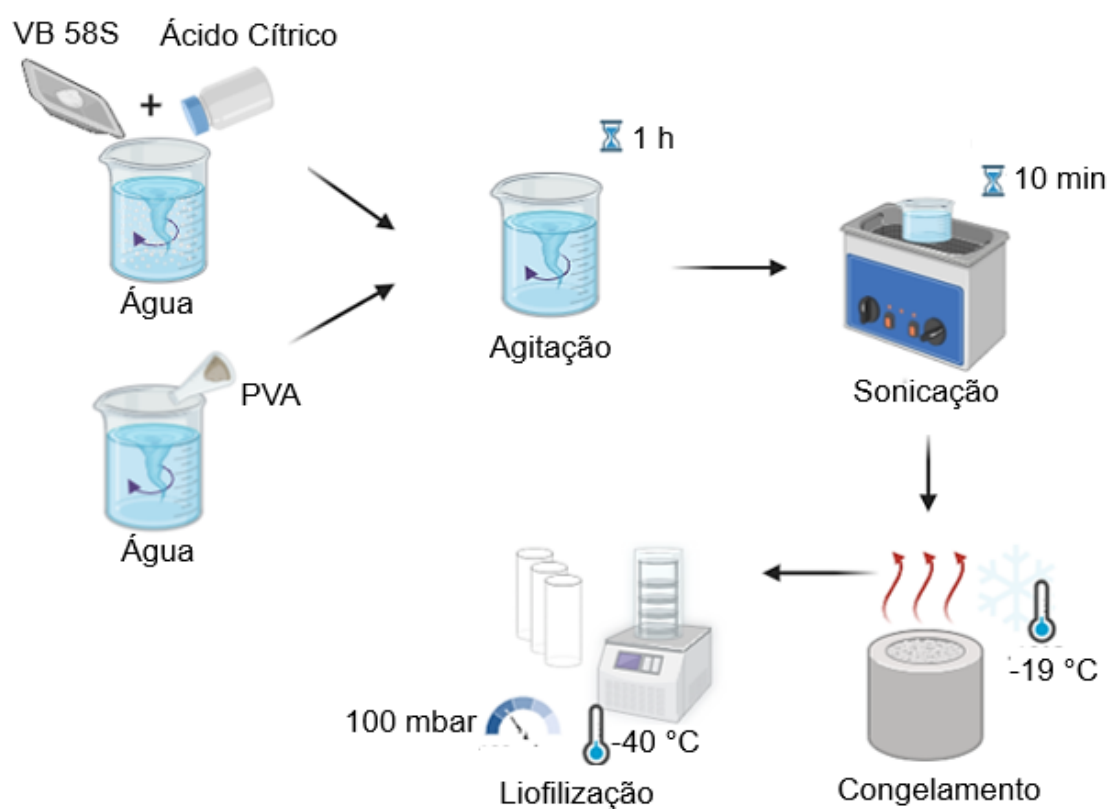


Figura 5.1 - Esquema da metodologia utilizada para preparar os *scaffolds* compósitos de 58S/PVA congelados por colagem.

5.2.4. Caracterização Estrutural

A densidade real dos materiais foi determinada por picnometria de gás hélio utilizando um Quantachrome MVP-1. Antes da análise, as amostras foram maceradas e secas a 100 °C. A granulometria a laser foi conduzida em um Cilas 1064, com dispersão das amostras em água sem adição de dispersantes. Para a adsorção de N₂, foi utilizado um Quantachrome Nova 1200e, no qual as amostras foram degaseificadas a 150 °C por 12 horas. A área superficial específica foi calculada pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET) e o tamanho médio de poros foi estimado pela relação entre o volume específico de mesoporos e a área superficial específica, conforme a equação:

$$\bar{d} = \frac{4V_{mes}}{A_{esp}}, \quad \text{Eq. 5.1}$$

onde V_{mes} representa o volume específico de mesoporos ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) e A_{esp} a área superficial específica ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) obtida pelo método BET.

A análise de DRX foi conduzida com um difratômetro Philips-PANalytical PW 1710, operando a 40 kV e 30 mA, com passo de 0,06° e radiação CuK α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). Os picos de difração obtidos foram comparados com a base JCPDS para identificar as fases cristalinas. A análise de FTIR foi realizada em um espectrômetro Bruker Alpha, equipado com ATR (refletância total atenuada) e cristal de diamante. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 128 varreduras, visando identificar as ligações químicas presentes nos materiais.

A análise de MEV foi realizada no microscópio Jeol JSM-6360LV, sob tensão de aceleração de 10 kV. Os *scaffolds* foram fraturados após imersão em nitrogênio líquido e fixados com fita de carbono dupla face. Todas as amostras foram revestidas com ouro em uma espessura de 10 nm por pulverização catódica antes da análise. A EDS foi realizada com sistemas NORAN acoplados aos microscópios, permitindo determinar a composição elementar.

A microtomografia computadorizada (micro-CT) foi realizada em um Bruker SkyScan 1174, com tensão de 50 kV, corrente de 800 μA , filtro de alumínio de 0,5 mm e resolução de pixel de 10,03 μm , possibilitando reconstruções tridimensionais das estruturas

internas. Para determinar as frações de poros abertos e fechados, o método de Arquimedes foi conduzido em uma balança Marte AD330. Inicialmente, a massa seca (M_{Seco}) foi registrada, seguida pela submersão da amostra em água sob vácuo (160 mmHg por 10 minutos) para preenchimento dos poros. As massas submersas (M_{Submerso}) e úmidas ($M_{\text{Úmido}}$) foram medidas. As frações de poros abertos e fechados foram calculadas usando as equações:

$$P_{\text{Aberta}}(\%) = \left(\frac{M_{\text{Úmido}} - M_{\text{Seco}}}{M_{\text{Úmido}} - M_{\text{Submerso}}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 5.2}$$

$$P_{\text{Total}}(\%) = \left(\frac{\rho - B}{\rho} \right) \times 100\% \quad \text{Eq. 5.3}$$

$$B = \left(\frac{M_{\text{Seco}}}{M_{\text{Úmido}} - M_{\text{Submerso}}} \right) \times \rho_{\text{água}} \quad \text{Eq. 5.4}$$

$$P_{\text{Fechada}} = P_{\text{Total}} - P_{\text{Aberta}}, \quad \text{Eq. 5.5}$$

onde P_{Total} corresponde à porosidade total do material.

Aa dimensões das amostras ($n=6$), foram medidas com paquímetro Mitutoyo de resolução 0,01 mm. O diâmetro e a altura dos corpos cilíndricos foram medidos três vezes por corpo de prova e utilizada a média. Os testes de compressão uniaxial foram realizados em uma Shimadzu AGS-X, com taxa de deslocamento controlada de $0,01 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ e célula de carga de 5 kN, à temperatura ambiente. Os corpos de prova cilíndricos (1 cm de diâmetro e 2 cm de altura) seguiram a norma ASTM C1424.

5.2.5. Bioatividade

A bioatividade foi avaliada pela imersão, em triplicata, de porções dos biomateriais em SBF (Simulated Body Fluid), conforme Kokubo e Takadama, em uma concentração de $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por até 14 dias. As amostras foram lavadas com álcool absoluto, secas ao ar a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas, e caracterizadas por MEV, EDS, FTIR e DRX.

5.2.6. Viabilidade Celular

A avaliação da citotoxicidade foi realizada de acordo com a norma ISO 10993-12 (Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos - Parte 12: Preparação de Amostras e

Materiais de Referência) utilizando o método de extrato. Os *scaffolds* foram esterilizados sob luz ultravioleta (UV) por 4 horas e, em seguida, incubados em DMEM (10 g.L^{-1}) por 24 ± 2 horas a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ para obter um extrato líquido. O extrato obtido foi aplicado diretamente às células, substituindo o meio sem filtração.

Para avaliar o perfil de citotoxicidade *in vitro* das amostras preparadas, fibroblastos pulmonares fetais humanos (MRC-5) foram cultivados em frascos de cultura celular de 50 mL. O meio de cultura utilizado foi o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/Aldrich), suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de estreptomicina. Esse meio consistia em DMEM contendo 4500 mg.L^{-1} de glicose, 4 mM de glutamina, 11 mg.L^{-1} de piruvato de sódio e $3,7 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio. As células foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em uma incubadora de CO_2 (Thermo 311) com uma atmosfera controlada de 95 % O_2 , 5 % CO_2 e 95 % de umidade relativa. Após atingir a confluência adequada, aproximadamente 10^8 células foram semeadas em placas de cultura celular de 12 poços contendo o extrato composto previamente preparado. As placas foram mantidas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas em uma incubadora de CO_2 para promover a adesão celular. Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos ($n = 3$ por grupo): (i) solução estéril de NaCl (0,9 % p/v) como controle negativo; (ii) solução de DMSO (20 %) como controle positivo; (iii) amostras de teste. Todos os ensaios de cultura celular e citometria de fluxo foram realizados em conformidade com as normas de biossegurança da ISO 10993-5 (Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos - Parte 5: Testes de Citotoxicidade *In vitro*). Esses experimentos foram realizados em triplicata, e 20.000 eventos foram registrados para cada amostra. Parâmetros como espalhamento lateral (SSC), espalhamento frontal (FSC) e emissões de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) foram incluídos nessas análises.

A caracterização morfológica das células tratadas foi investigada por microscopia óptica, conduzida em um microscópio Nexcope NIB620-FL. As células tratadas e os controles foram investigados para identificar padrões de citotoxicidade morfológica nas células estudadas, como apoptose precoce ou tardia, células em fase necrótica, blebs apoptóticos e mudanças no citoesqueleto celular. As células foram imagiadas com ampliação típica de 20 ou 40X, e corante foi empregado.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, verificados por Shapiro-Wilk (normalidade) e ANOVA, com pós-teste de Tukey para $p < 0,05$.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Vidro Bioativo

O padrão de DRX do vidro bioativo 58S é exibido na Figura 5.2(a). Observa-se um amplo halo centrado em aproximadamente 28° (2θ), revelando que o vidro derivado de sol-gel possui uma rede amorfa [229]. Relata-se que a estrutura amorfa do vidro bioativo acelera sua taxa de dissolução em ambientes fisiológicos e melhora sua bioatividade [230,231]. A Figura 5.2(b) mostra o espectro de FTIR obtido para o vidro bioativo. As bandas de absorção em 1030 cm^{-1} e 450 cm^{-1} correspondem aos modos de alongamento e flexão das ligações Si-O-Si. A banda em 1425 cm^{-1} foi relacionada a grupos CO_3^{2-} [232], enquanto a banda em 820 cm^{-1} corresponde aos modos vibracionais das ligações Si-O-2NBO (oxigênio não-ligante), indicando a presença de modificadores de rede na composição do vidro. A banda em 1630 cm^{-1} é atribuída à água fisicamente adsorvida [233]. Grupos hidroxila são responsáveis pela ampla banda de absorção centrada em cerca de 3400 cm^{-1} [233]. O duplete em 2350 cm^{-1} foi associado ao CO_2 atmosférico [234]. Espectros de FTIR semelhantes ao mostrado na Figura 5.2(b) têm sido relatados para o vidro bioativo 58S, confirmando a síntese bem-sucedida deste material em nosso estudo [235–237].

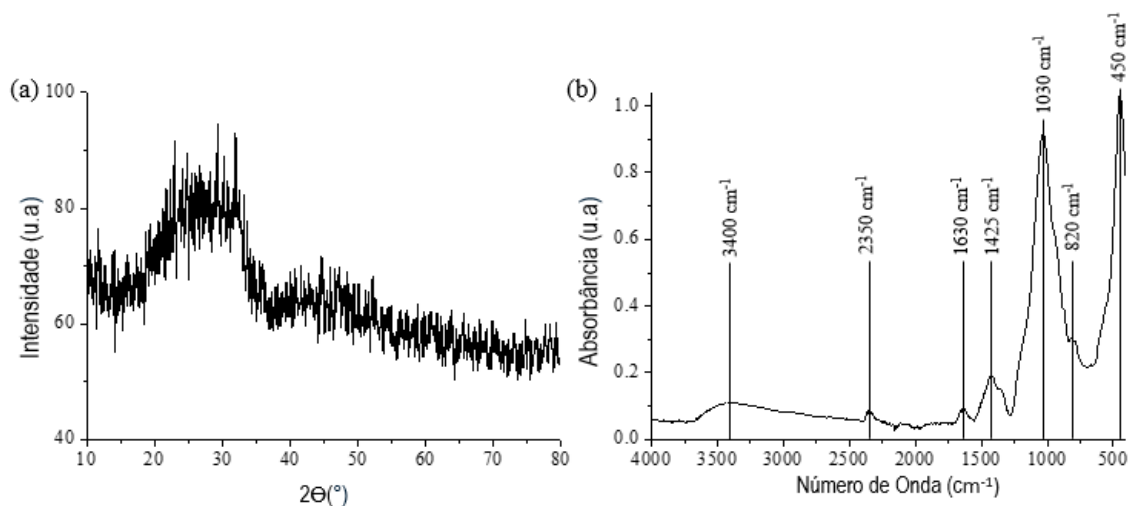


Figura 5.2 - (a) Padrão de DRX, (b) espectro de FTIR do vidro bioativo 58S.

A isoterma de sorção de N₂ obtida para o vidro bioativo 58S é representada na Figura 5.3(a). De acordo com a classificação da IUPAC [238], essa isoterma é muito semelhante a uma isoterma do tipo IV, com um amplo ciclo de histerese. Isotermas do tipo IV são típicas de materiais mesoporosos caracterizados por poros com diâmetros variando de 2 nm a 50 nm. A presença de poros, onde moléculas de N₂ ficam presas durante a dessorção, é sugerida pelo ciclo de histerese observado. A área de superfície específica, determinada usando a teoria de Brunauer-Emmett-Teller (BET), foi medida em aproximadamente 280 m².g⁻¹. Além disso, o volume específico de poros e o tamanho médio dos poros foram determinados em 0,45 cm³.g⁻¹ e 6,4 nm, respectivamente. Vidros bioativos preparados pela abordagem sol-gel são conhecidos por sua maior área de superfície e volume de poros em relação às mesmas composições produzidas o por fusão, o que aumenta significativamente sua eficácia em sistemas biológicos [239,240]. A Figura 5.3(b) mostra a distribuição do tamanho de partícula obtida por granulometria a laser. A curva cumulativa começa a subir em cerca de 0,1 μm e atinge um platô em aproximadamente 100 μm, indicando uma ampla distribuição de tamanho de partícula. Distribuições amplas de tamanho de partícula são comumente observadas em materiais cominuídos mecanicamente [241]. O tamanho médio das partículas desse vidro é 18 μm.

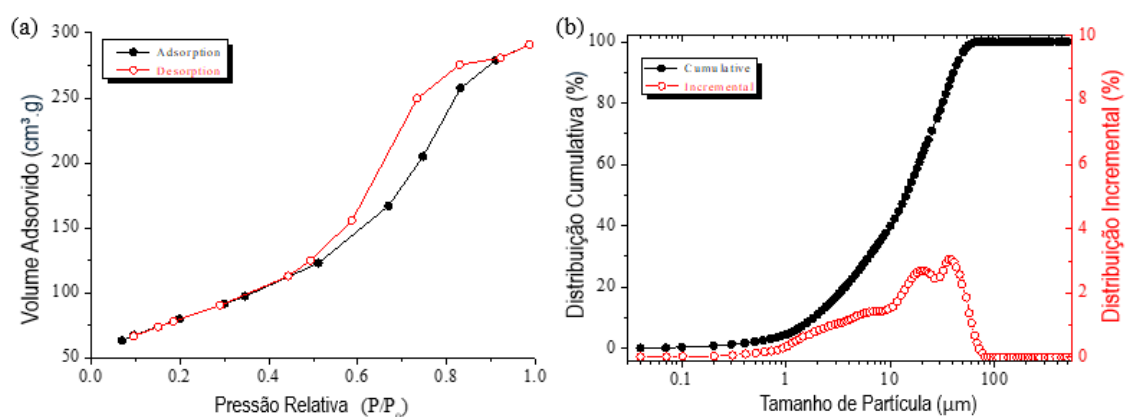


Figura 5.3 - (a) Isoterma de adsorção de N₂, (b) distribuição do tamanho de partículas

5.3.2. Análise estrutural e mecânica de *scaffolds*

A Figura 5.4 mostra a estrutura macroporosa dos *scaffolds* de 58S/PVA produzidos por *freeze-casting* em diferentes proporções de massa e uma reconstrução de *scaffold* de proporção 90/10. É possível observar nas micrografias de MEV, poros interconectados característicos de amostras conformadas por esse processo. Esses poros são críticos para

a regeneração óssea, pois permitem que vasos sanguíneos e células infiltrem-se por toda a rede macroporosa, promovendo a bioatividade. Diferentemente dos poros lamelares encontrados em *scaffolds* que utilizam somente água como solvente já reportados na literatura [177,242,243], os poros encontrados foram arredondados. Essa morfologia diferente é esperada devido à alta concentração de polímero no solvente ($0,10 \text{ g.ml}^{-1}$) que eleva a viscosidade e dificulta o crescimento dos cristais do solvente durante a solidificação. Isso leva à formação de poros menores, com uma estrutura mais compacta e homogênea [175].

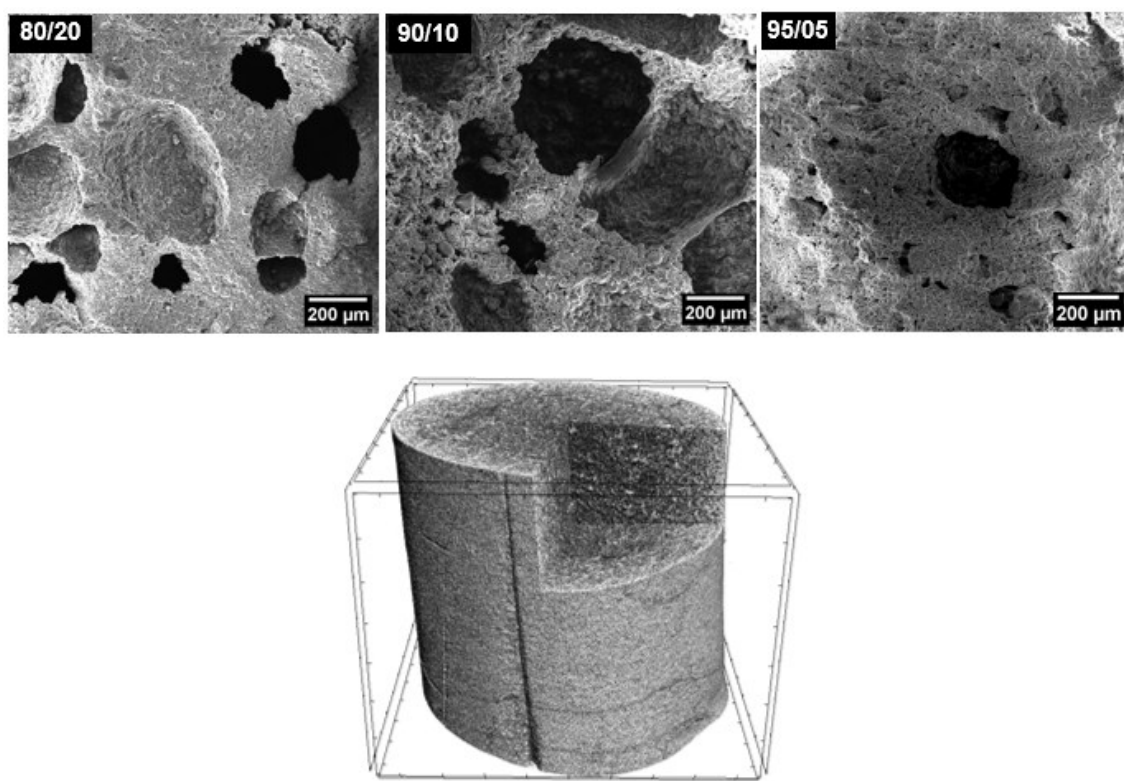


Figura 5.4 - Micrografias de MEV de *scaffolds* porosos, mostrando diferentes composições de 58S e PVA e reconstrução por Micro-CT de *scaffold* de proporção 90/10.

A Figura 5.5(a) mostra a porosidade aberta, fechada e total dos *scaffolds* preparados em função da proporção de 58S/PVA medidas por Arquimedes e a Tabela 5.1 sumariza esses mesmos dados, letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos para $p < 0,05$. Um padrão claro é que, à medida que a proporção de vidro 58S aumenta em relação ao PVA, tanto a porosidade aberta quanto a total aumentam, enquanto a porosidade fechada diminui. As curvas mostram um aumento significativo na porosidade total de cerca de 69 % para uma razão de 58S/PVA de 80/20 para quase 80 % para uma razão de

95/05. Por outro lado, a porosidade fechada diminuiu de aproximadamente 27 % para 6 % na mesma faixa.

A distribuição do tamanho de poros (Figura 5.5b) elucida ainda mais as diferenças estruturais entre os *scaffolds*. Os diâmetros medianos dos poros são $63,7 \pm 23,9 \mu\text{m}$, $83,2 \pm 31,2 \mu\text{m}$ e $102,4 \pm 38,4 \mu\text{m}$ para as proporções de 58S/PVA de 80/20, 90/10 e 95/05, respectivamente. Isso indica que o aumento da proporção de 58S resulta em maiores tamanhos médios de poros, maior porosidade total e menos poros isolados, contribuindo para uma maior taxa de interconectividade e potencialmente melhorando a adequação do *scaffold* para aplicações em engenharia de tecidos ósseos. De modo contrário, o aumento da proporção de um polímero com elevada massa molar, $146.000\text{-}186.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, além de obstruir poros e diminuir a interconectividade, faz com que os poros tenham dificuldades de crescimento durante o congelamento resultando em diâmetros menores [175,244,245]

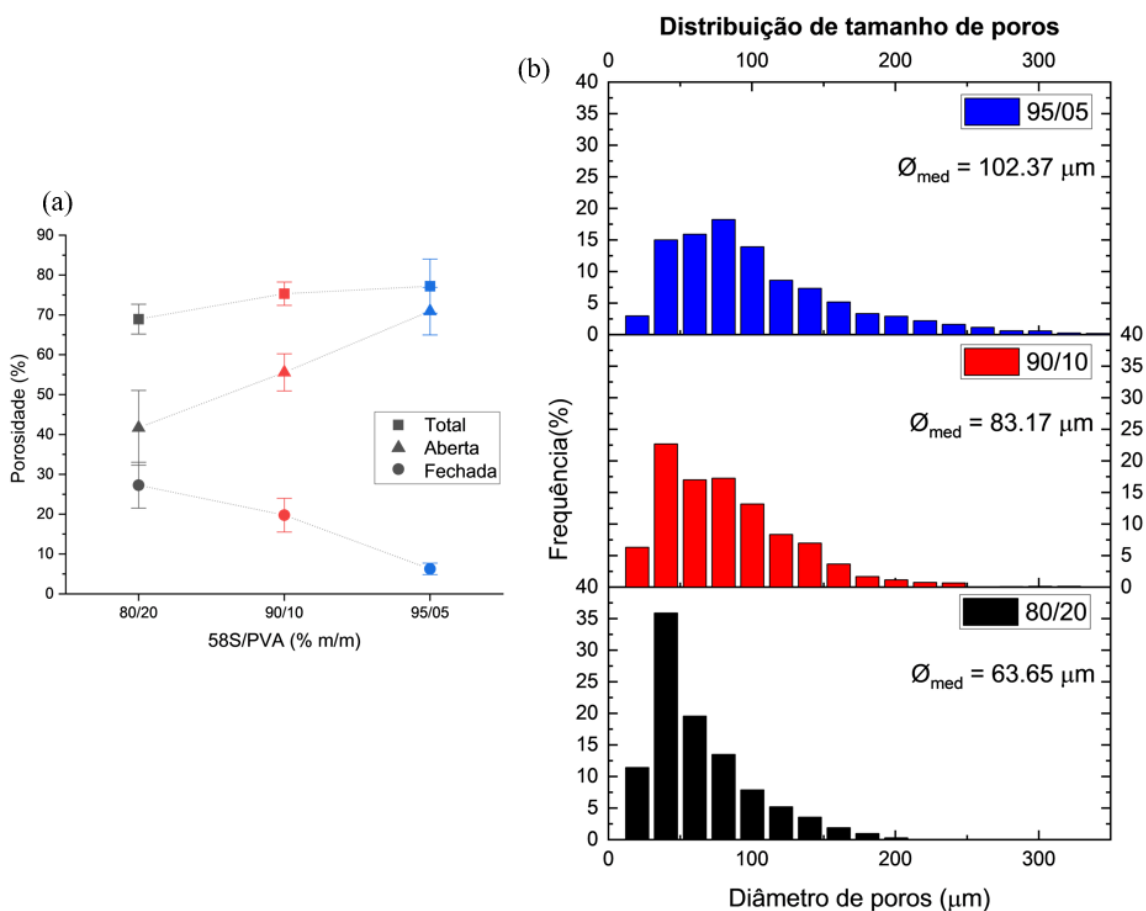


Figura 5.5 – Avaliação da porosidade por Arquimedes dos *scaffolds* compósitos de 58S/PVA preparados em diferentes razões de carga (a) e distribuição do diâmetro dos poros medida por micro-CT (b).

Tabela 5.1 – Porosidade fechada, aberta e total dos *scaffolds* medida por Arquimedes.

| Amostras | Porosidade fechada (%) | Porosidade aberta (%) | Porosidade total (%) | |
|------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Scaffolds 58S/PVA | 80/20 | 27,8 ± 5,2 ^a | 41,9 ± 9,7 ^a | 69,8 ± 5,1 ^a |
| | 90/10 | 17,4 ± 1,9 ^b | 57,1 ± 5,5 ^b | 74,5 ± 3,6 ^a |
| | 95/05 | 6,1 ± 1,2 ^c | 68,6 ± 6,4 ^c | 75,0 ± 7,1 ^a |

A Figura 5.6(a) mostra as curvas de tensão-deformação obtidas nos testes de compressão, enquanto a Figura 5.6(b) exibe os valores de resistência à compressão, módulo de Young e tenacidade calculados a partir dessas curvas, assim como a Tabela 5.2, letras diferentes indicam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Essas propriedades são críticas para a capacidade do *scaffold* de suportar cargas durante a implantação e sustentar o crescimento ósseo. O *scaffold* composto com uma proporção de 80/20 de 58S/PVA apresentou o melhor desempenho, o de proporção de 90/10 de 58S/PVA apresentou valores intermediários enquanto o *scaffold* de proporção de 95/05 de 58S/PVA apresentou os menores valores. *Scaffolds* puros de PVA produzidos por *freeze-casting* e com porosidade de 70% foram reportados na literatura com valores de resistência à compressão de $5,39 \pm 0,82$ MPa e Módulo de Young de $0,19 \pm 0,02$ GPa [246]. Já os *scaffolds* de VB 58S, com 64 % de porosidade, sinterizados a 1250 °C por 2 horas, apresentaram uma resistência à compressão de $1,5 \pm 0,3$ MPa [247]. Os dois materiais puros foram descritos na literatura com resistência a compressão inferior à maior parte das proporções testadas neste trabalho.

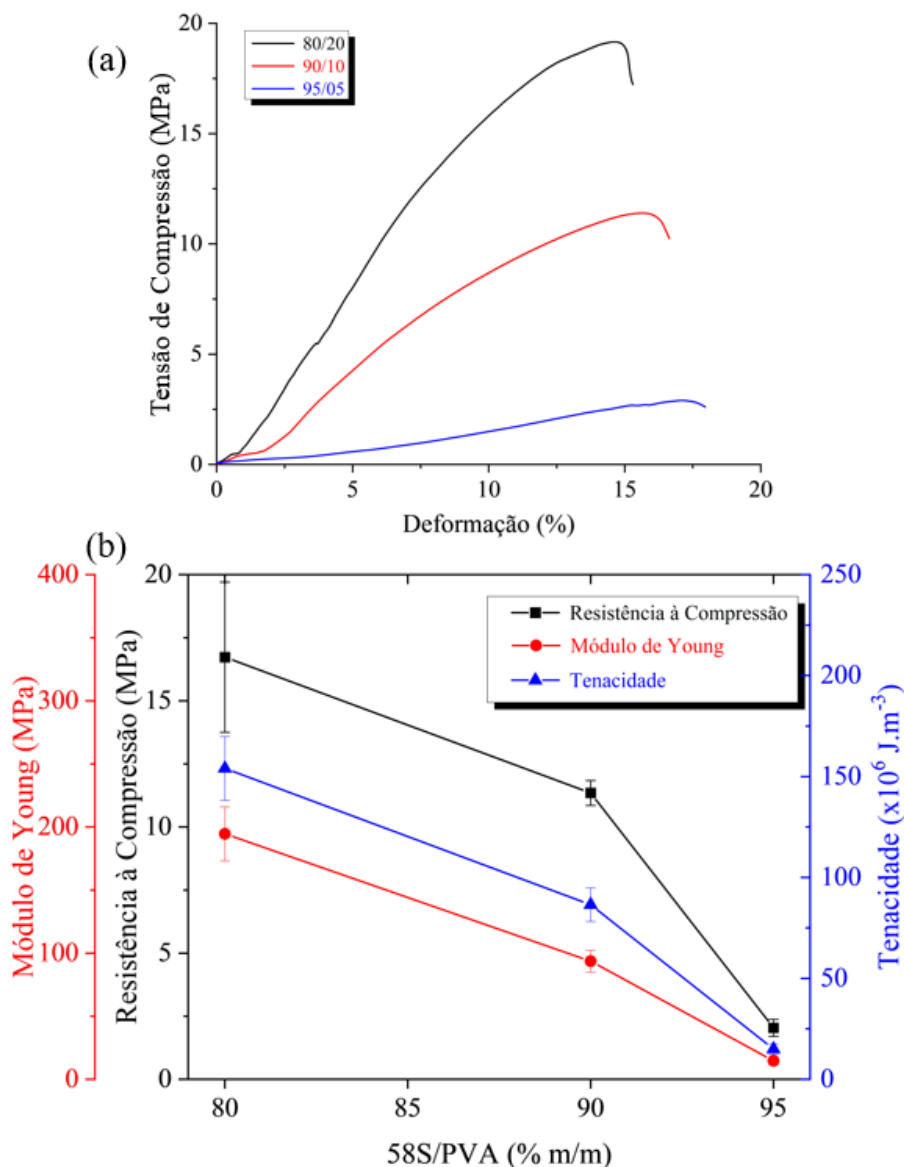


Figura 5.6 - (a) Curvas obtidas a partir de testes de compressão, (b) valores de resistência à compressão, módulo de Young e tenacidade calculados a partir dessas curvas.

Tabela 5.2 – Resistência à compressão, Módulo de young e módulo de Tenacidade de de *scaffolds* produzidos.

| Amostras | Resistência à compressão (MPa) | Módulo de Young (GPa) | Módulo de Tenacidade ($\times 10^6 \text{ J.m}^{-3}$) |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|---|
| 80/20 | 16,7 ± 3,0 ^a | 0.19 ± 0.02 ^a | 154,0 ± 15,8 ^a |
| Scaffolds 58S/PVA | | | |
| 90/10 | 11,4 ± 0,5 ^b | 0.09 ± 0.08 ^b | 86,5 ± 8,3 ^b |
| 95/05 | 2,0 ± 0,3 ^c | 0.01 ± 0.03 ^c | 15,0 ± 2,6 ^c |

Esses resultados indicam que concentrações mais altas de vidro bioativo resultam em compósitos com menores resistência à compressão e tenacidade. Por outro lado, o aumento do conteúdo de PVA possui efeito inverso no *scaffold*. Segundo Martínez-Vázquez *et al.* [248], a incorporação de polímeros em estruturas cerâmicas favorece a transferência de carga da fase cerâmica para a fase polimérica, aumentando assim a resistência mecânica do *scaffold*. Além disso, o polímero pode preencher defeitos presentes na estrutura do *scaffold*, conectar partículas cerâmicas com suas longas cadeias orgânicas e aumentar a tensão necessária para a propagação de trincas.

A capacidade de ajustar as propriedades mecânicas desses *scaffolds* pela variação da proporção de 58S/PVA é particularmente vantajosa para a engenharia de tecidos ósseos. Isso permite a preparação de *scaffolds* que possam mimetizar solicitações mecânicas similares ao osso trabecular (Resistência à compressão 2,0 a 12,0 MPa e Módulo de Young 0,01 a 3,0 GPa) [56], o que é essencial para promover a atividade celular e a integração tecidual bem-sucedida. Os parâmetros de porosidade e resistência mecânica à compressão e tenacidade são inversamente proporcionais nesse caso, por isso amostras com maiores teores de polímero são mais promissoras em aplicações de suporte de carga, enquanto aqueles com maiores proporções de vidro bioativo são mais indicados para situações nas quais porosidade aberta seja mais crítica. Além disso, o desempenho variável de diferentes proporções destaca a importância de otimizar as formulações dos compósitos com base nas necessidades clínicas específicas.

5.3.3. Bioatividade

A formação de HAp nos *scaffolds* compostos após imersão em SBF por até 14 dias é evidenciada nas Figuras 5.7a e 5.7b. O *scaffold* com a maior proporção de vidro bioativo (95/05) apresentou a formação de HAp mais rápida e pronunciada. Desde o primeiro dia de imersão, picos distintos de HAp são evidentes em seus padrões de DRX (Figura 5.7a), consistentes com aqueles encontrados no arquivo JCPDS N° 09-0432. Além disso, bandas de absorção características dos grupos PO_4^{3-} foram observadas em seu espectro de FTIR (Figura 5.7b), corroborando ainda mais para a proposição de formação de HAp. Em particular, as bandas em 1020 cm^{-1} , 600 cm^{-1} e 560 cm^{-1} são atribuídas aos grupos PO_4^{3-} do HAp [85,249]. Por outro lado, os *scaffolds* 90/10 e 80/20 de 58S/PVA mostraram um aumento gradual na formação de HAp. No terceiro dia, picos indicativos de HAp

começaram a aparecer em seus padrões de DRX, acompanhados por bandas de absorção bem definidas dos grupos fosfato nos espectros de FTIR. No entanto, provavelmente devido ao seu maior conteúdo de PVA, o *scaffold* 80/20 mostrou uma demora no aparecimento de bandas, indicando uma formação mais lenta de HAp. O comportamento da redução da bioatividade com o aumento da carga polimérica tem sido reportada na literatura em compósitos de vidro bioativo e polímeros como PVA e PCL [250–252]

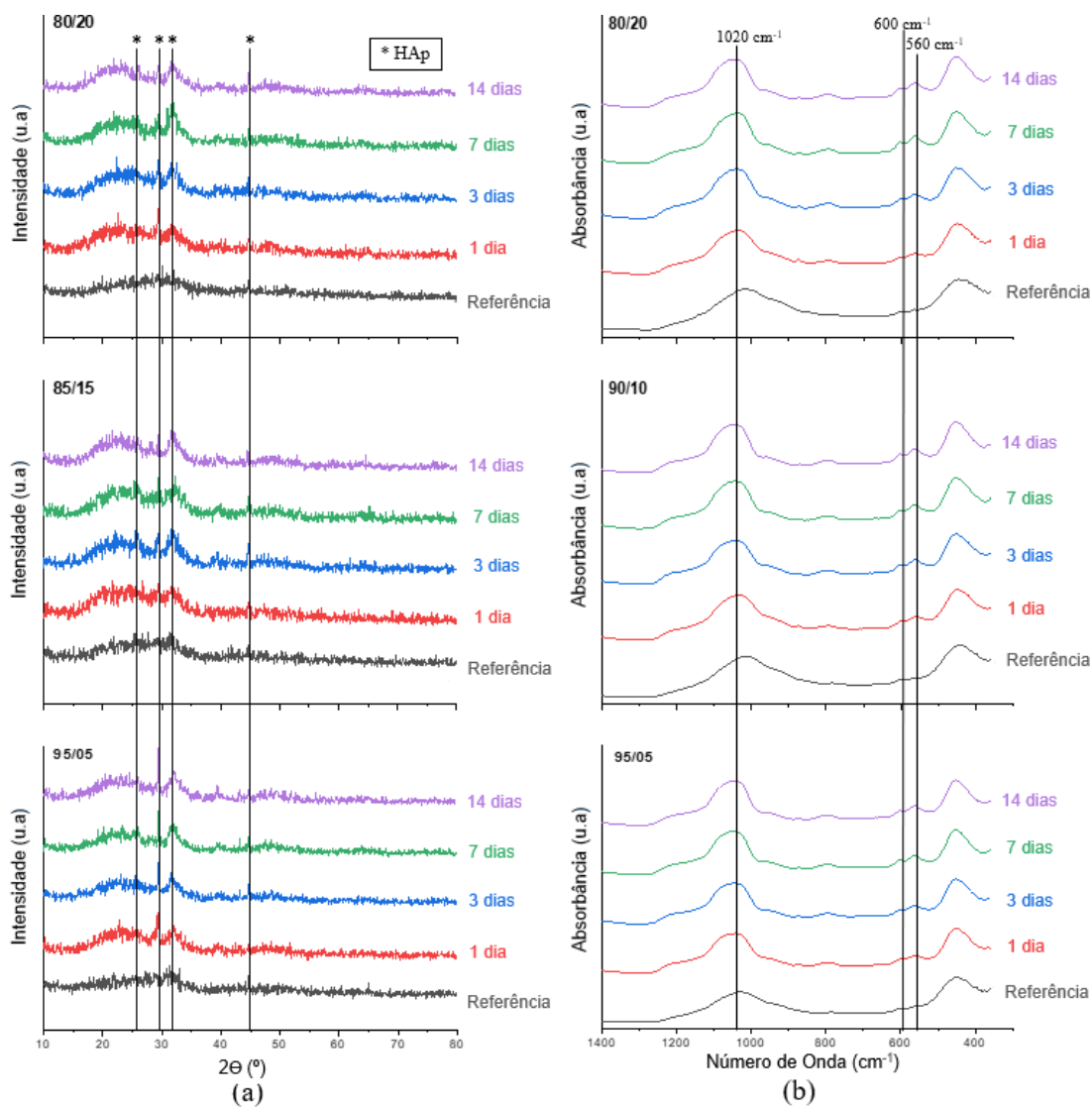


Figura 5.7 - (a) Análises de DRX e (b) FTIR realizadas em *scaffolds* compósitos imersos em SBF por até 14 dias.

A Figura 5.8 mostra micrografias de MEV dos *scaffolds* compostos preparados com diferentes proporções de 58S/PVA, antes de imersão em SBF, à esquerda, e após 7 dias imersão, à direita. O *scaffold* 95/05 inicialmente mostra uma superfície povoada por partículas de vidro levemente revestidas com PVA antes da imersão em SBF. Após a

imersão em SBF, ele apresenta um crescimento expressivo de estruturas semelhantes à HAp, caracterizado por uma camada densa e uniforme com partículas residuais mínimas de 58S.

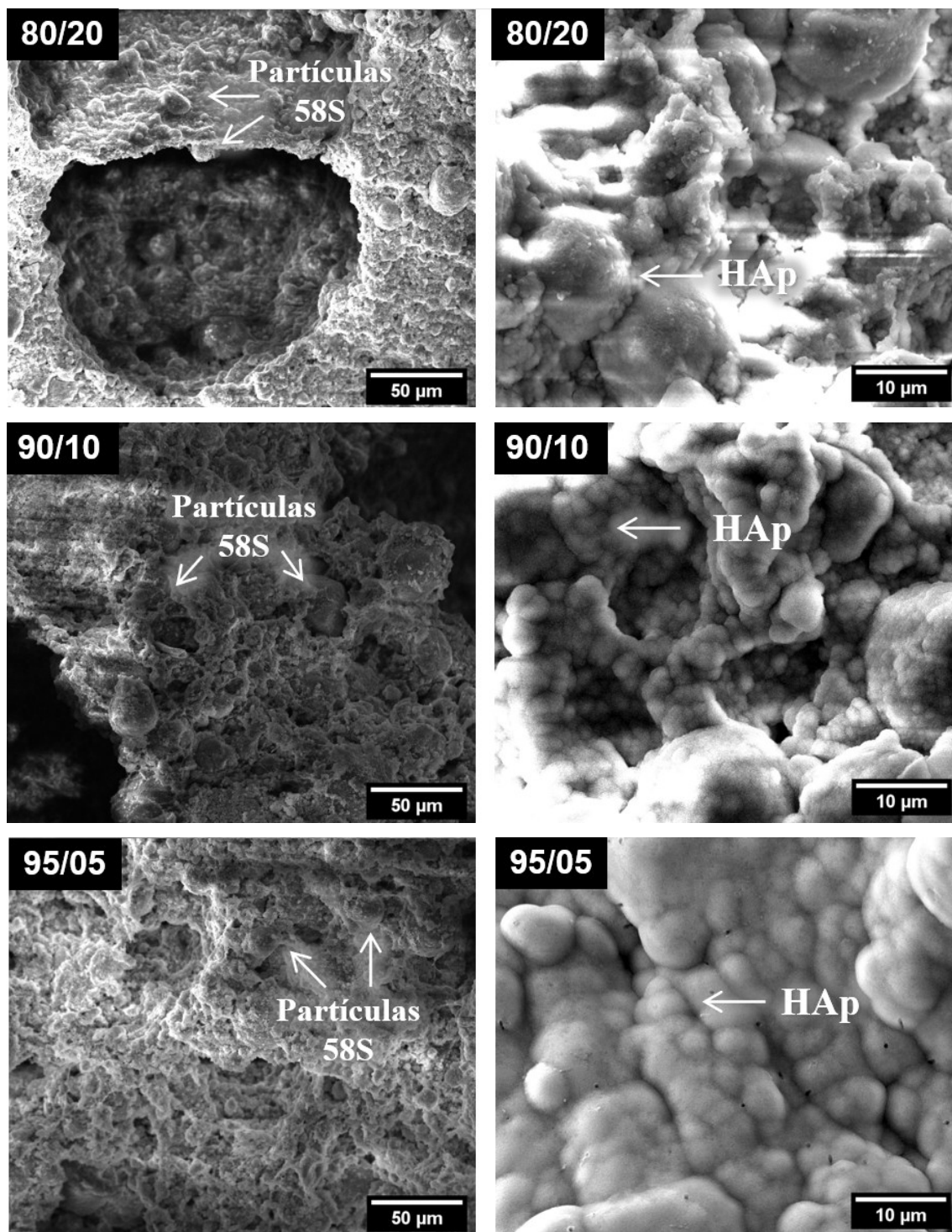


Figura 5.8 - Micrografias de MEV realizadas em *scaffolds* antes de imersão em SBF (esquerda) e mantidos em SBF por 7 dias (direita).

A análise de EDS da Figura 5.9 e Tabela 5.3 exibe uma razão Ca/P de 1,87, próxima da razão estequiométrica do HAp (1,67), destacando seu potencial para biointegração rápida. Tanto os *scaffolds* 90/10 quanto 80/20 também mostram superfícies com partículas de vidro revestidas antes da imersão em SBF. Após a imersão, eles exibem estruturas de HAp densamente compactadas. No entanto, o *scaffold* 90/10 possui uma razão Ca/P mais baixa de 1,83 em comparação com 1,93 para o *scaffold* 80/20. Essa razão mais baixa no *scaffold* 90/10 sugere um excesso de cálcio ou carência de fósforo, o que poderia potencialmente afetar a cristalinidade e a estabilidade da HAp formada. Além disso, o *scaffold* 80/20 retém algumas partículas residuais de 58S, com a HAp aparecendo como aglomerados esféricos. Essas observações sugerem que a composição do *scaffold* influencia a morfologia e a composição da HAp formada durante a imersão em SBF, fatores críticos para seu desempenho em aplicações de engenharia de tecidos ósseos.

Tabela 5.3 – Valores do espectro EDS da superfície geral do *scaffold* e da estrutura de HA, com a razão molar Ca/P

| | Composição do Scaffold | Ca (molar %) | P (molar %) | Proporçã o Ca/P |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|
| Scaffold Superfície | 80/20 | 32,67 | 16,63 | 1,96 |
| | 90/10 | 38,40 | 20,53 | 1,87 |
| | 95/05 | 31,12 | 18,41 | 1,69 |
| Estrutura HA | 80/20 | 36,79 | 19,08 | 1,93 |
| | 90/10 | 39,06 | 21,31 | 1,83 |
| | 95/05 | 32,24 | 20,57 | 1,57 |

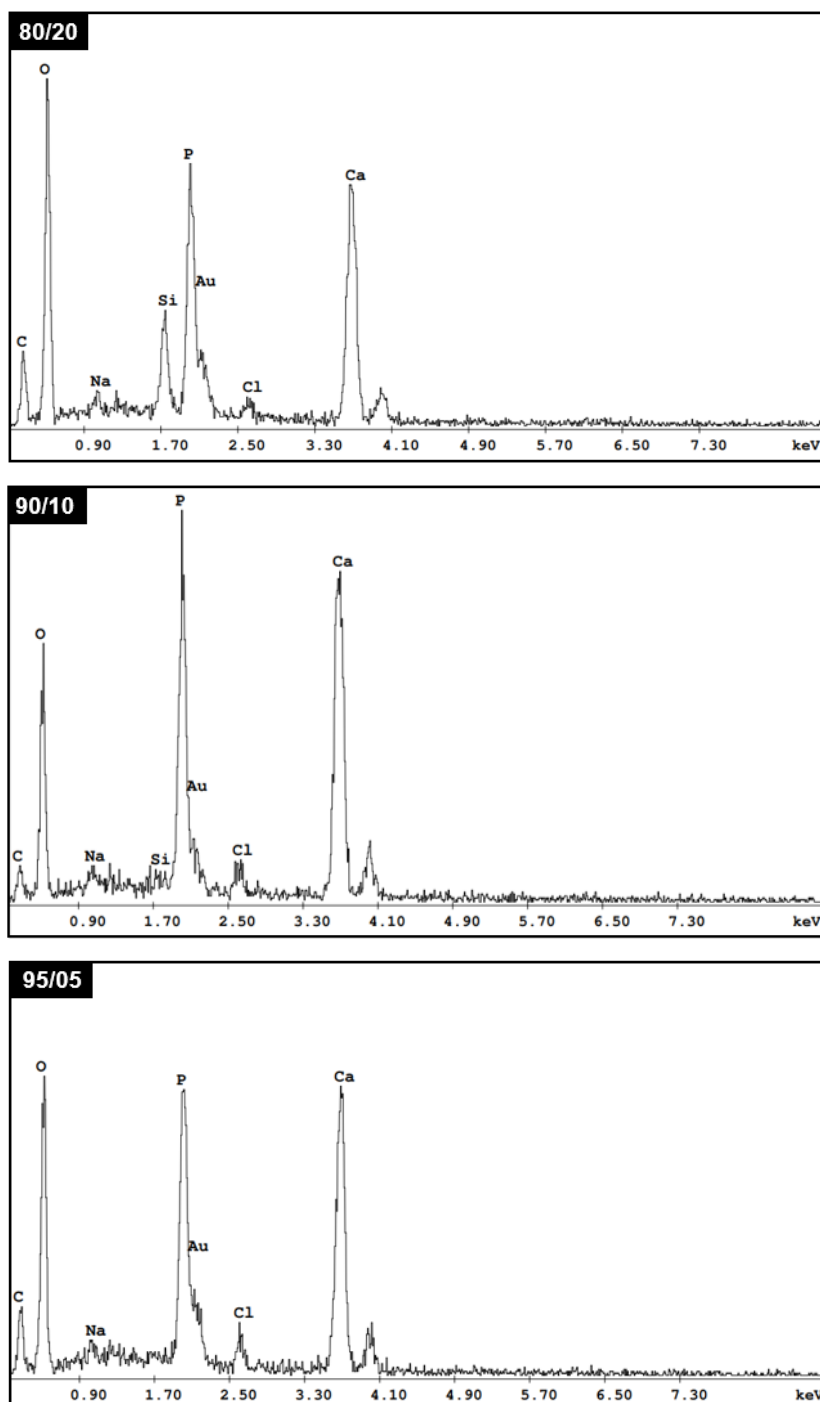


Figura 5.9 – Espectros de EDS de *scaffolds* imersos em SBF por 7 dias.

5.3.4. Viabilidade celular

A Tabela 5.4 revela que a viabilidade celular em extrato de *scaffolds* excede 70 %, valor abaixo do qual o material apresenta algum grau de citotoxicidade, indicando condições favoráveis para a saúde e proliferação celular, letras diferentes representam diferença

significativa para $p < 0,05$. Este achado é apoiado pelos painéis de citometria de fluxo mostrados na Figura 5.10, onde parâmetros como tamanho celular (FSC) e complexidade interna (SSC) são consistentes com aqueles de populações celulares saudáveis. A viabilidade celular diminui, significativamente, com o aumento da proporção de 58S e diminuição de PVA, que recobre a superfície do vidro. Ao evitar que haja trocas iônicas entre o vidro e o meio, o PVA diminui a cinética química, bem como a concentração de íons liberados [252]. As células MRC-5 são muito sensíveis ao pH do meio e concentração de íons, e apesar de não apresentarem mortandade que caracteriza o material como citotóxico, sofre influência negativa em extratos de altas proporções de VB [253].

Imagens de microscopia óptica também mostram alta densidade celular em toda a superfície de cultivo com mínimo descolamento, fornecendo evidências adicionais de uma robusta adesão e crescimento celular. A morfologia alongada e fusiforme observada na Figura 5.11 é indicativa de boa adesão celular ao substrato, o que garante a manutenção da célula. Essa morfologia é tipicamente associada a células que estão ativamente sintetizando componentes da matriz extracelular, um aspecto crítico dos processos de regeneração tecidual.

Estudos futuros poderiam investigar a adesão em contato direto e liberação de íons a longo prazo desses *scaffolds* em ambientes biológicos mais complexos para validar sua adequação para aplicações clínicas.

Tabela 5.4 - Proporções médias de células vivas, mortas e viáveis em cada *scaffold* compósito preparado, conforme determinado por citometria de fluxo.

| | Amostra | Viabilidade celular (%) |
|-----------------------|----------------|--------------------------------|
| Grupo controle | Controle - | 88,5 ± 0,2a |
| | 80/20 | 83,3 ± 0,3a |
| Compósitos | 90/10 | 73,3 ± 0,4b |
| | 95/05 | 71,1 ± 0,4b |

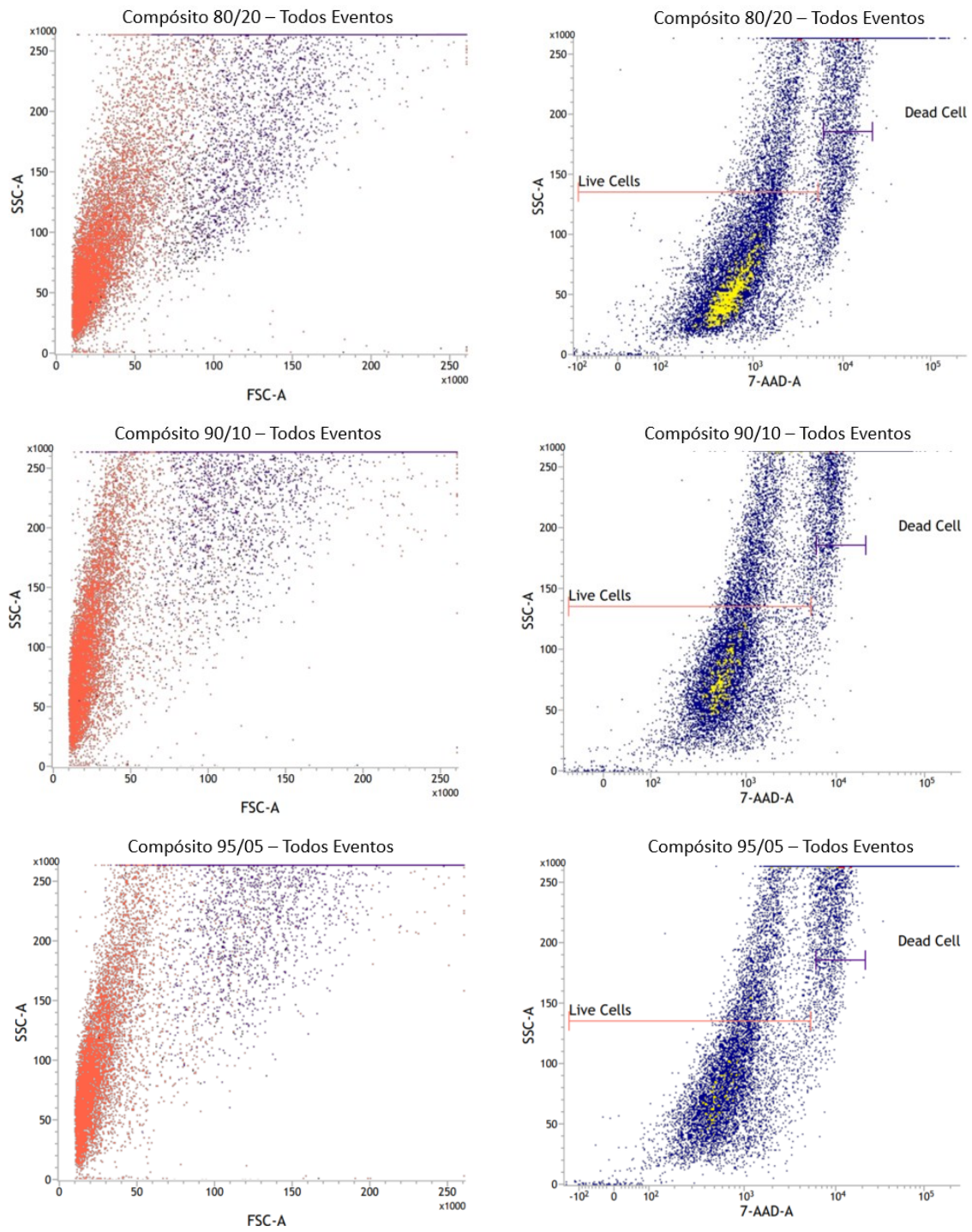


Figura 5.10 – Painéis de citometria de fluxo de células MRC-5 em cultivo com extrato de *scaffolds*.

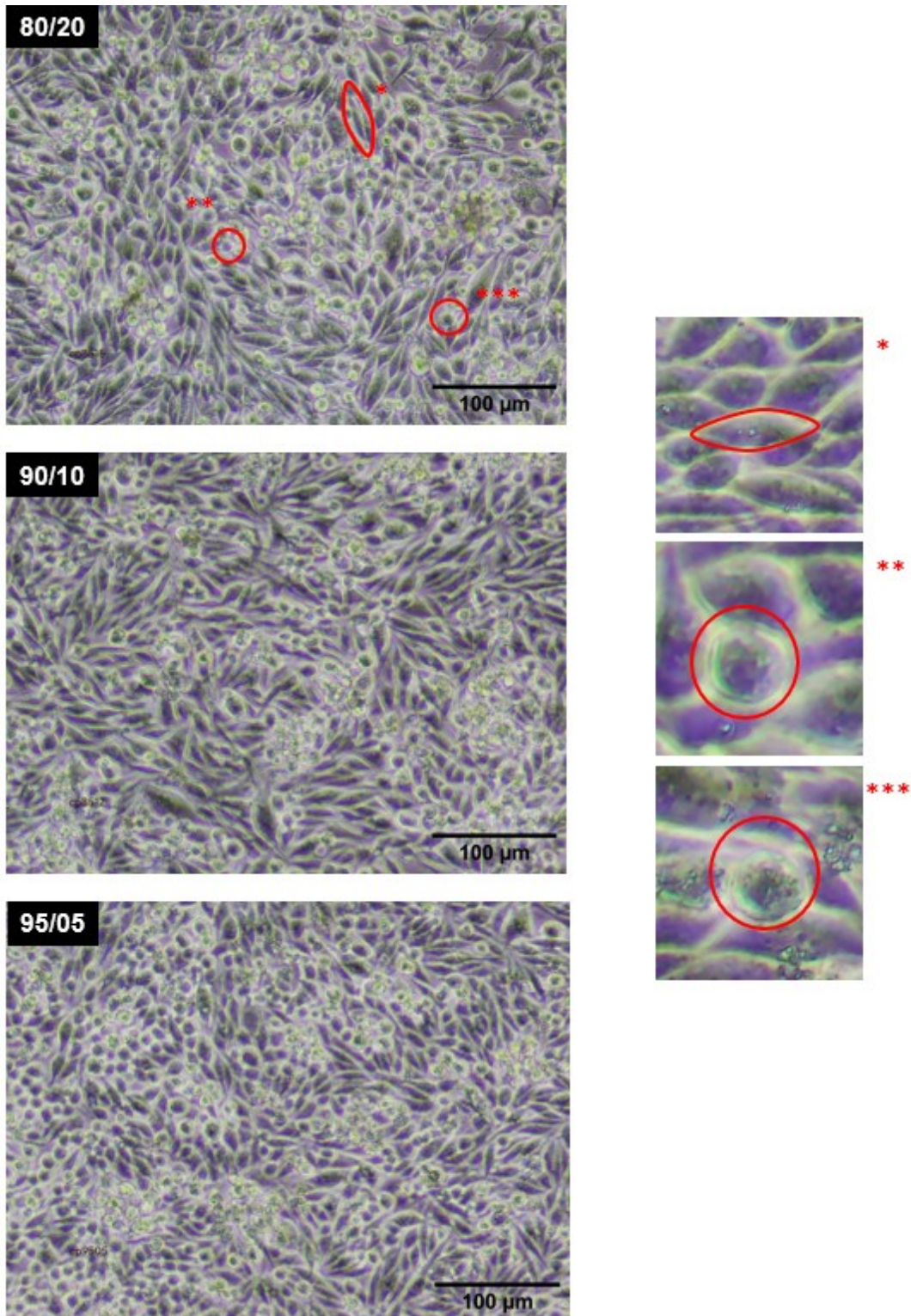


Figura 5.11 - Ensaio de microscopia óptica realizados em células MRC-5 cultivadas em extratos de *scaffolds* compósitos.

5.4. CONCLUSÃO PARCIAL

O objetivo central deste capítulo foi reportar o desenvolvimento de *scaffolds* utilizando os vidros bioativos 58S e PVA por meio da técnica de *freeze-casting* utilizando água como solvente, e avaliar os efeitos de diferentes proporções das fases nas propriedades dos materiais obtidos.

As partículas de vidro 58S foram sintetizadas pelo método sol-gel, resultando em uma estrutura predominantemente amorfa, com mesoporos e área superficial de $280,0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Além disso, apresentaram as ligações químicas características comumente observadas em redes desses vidros, conforme relatado na literatura.

Os *scaffolds* com 20% de volume de sólidos foram produzidos nas proporções 80/20, 90/10 e 95/05 com sucesso pelo método *freeze-casting* e apresentaram uma estrutura macroporosa de poros interconectados, favorável à regeneração óssea.

As análises de morfologia e porosidade, realizadas pelo princípio de Arquimedes, MEV e micro-CT, indicaram porosidades próximas a 70%, valor adequado para aplicações em medicina regenerativa, onde o mínimo estabelecido é 50% para que o material apresente potencial regenerativo. Os poros formados foram não lamelares, devido à alta concentração de PVA na água, o que altera a morfologia para poros arredondados e os torna menores em relação à *scaffolds* com menores concentrações de polímero. O aumento do conteúdo de 58S resultou na redução da porosidade fechada e aumento da porosidade aberta, mantendo os valores totais de porosidade sem diferença significativa.

Testes mecânicos mostraram que *scaffolds* com uma proporção de 80/20 de 58S/PVA atingiram maiores resistência à compressão ($16,7 \pm 3,0 \text{ MPa}$), módulo de Young ($194,6 \pm 21,3 \text{ MPa}$) e tenacidade ($154,0 \pm 15,8 \times 10^6 \text{ J} \cdot \text{m}^{-3}$), indicando que as longas cadeias poliméricas foram capazes de manter a estrutura cerâmica unida durante esforços mecânicos. A capacidade de ajustar essas propriedades por meio da carga polimérica destaca o potencial dos *scaffolds* para imitar a mecânica do osso trabecular em aplicações de suporte de carga.

As avaliações de bioatividade demonstraram a formação de HAp nas superfícies dos *scaffolds*, mais rapidamente naqueles com maior conteúdo de 58S (proporções 90/10 e 95/05), conforme verificado pelas análises de DRX e FTIR. O *scaffold* com proporção 95/05 apresentou a formação mais rápida de HAp, com razões estequiométricas de Ca/P, indicando um forte potencial de biointegração. Análises de MEV e EDS confirmaram camadas densas e uniformes de HAp após a imersão em SBF, reforçando suas propriedades bioativas.

Ensaio de citometria de fluxo mostraram viabilidade celular superior a 70%, confirmando a ausência de citotoxicidade. Embora os extratos utilizados tenham se mostrado eficientes para a avaliação da citotoxicidade, ensaios de contato direto poderiam fornecer informações mais detalhadas sobre as interações entre as células MRC-5 e os vidros bioativos.

Os resultados obtidos comprovam a eficácia da combinação do vidro 58S e PVA na fabricação de *scaffolds* bioativos amorfos com potenciais propriedades físicas e biológicas adequadas para regeneração óssea trabecular. A adição PVA permitiu a eliminação da etapa de sinterização dos *scaffolds* quando comparado ao vidro 58S puro (1250 °C), ou mistura entre 58S e 13-93 (650 °C), oferecendo vantagens expressivas em eficiência energética, redução do tempo de processamento e custo-benefício.

6. MANUFATURA ADITIVA DE HÍBRIDOS

6.1. INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta a pesquisa realizada no *Imperial College London*, na qual foi sintetizado um híbrido de vidro bioativo 58S e PVA, processado por impressão 3D, sob a orientação do Professor Dr. Julian Jones.

O VB 58S é amplamente reconhecido por suas propriedades osteocondutivas e bioativas, promovendo a formação de uma camada de hidroxiapatita na interface com o tecido ósseo, o que facilita sua integração com o osso natural. A combinação deste vidro com PVA, um polímero biocompatível e hidrofílico, busca não apenas preservar as propriedades bioativas, mas também melhorar a tenacidade e a processabilidade do material resultante, características essenciais para o processo de fabricação [143].

Dentre os processos de conformação existentes e disponíveis, a impressão 3D de biomateriais se destaca como uma técnica promissora no desenvolvimento de dispositivos médicos personalizados e soluções terapêuticas inovadoras, sendo escolhida como a técnica de produção do *scaffold*. A pesquisa realizada teve como objetivo otimizar a formulação e os parâmetros de impressão para desenvolver estruturas tridimensionais com propriedades mecânicas e biológicas adequadas, visando atender à demanda por novos materiais capazes de substituir ou reparar tecidos ósseos de forma eficaz e segura.

Embora existam estudos na literatura que relatam a produção de híbridos de vidro derivados do 58S e PVA utilizando agentes de acoplamento, como (3-glicidoxipropil) trimetoxisilano (GPTMS) e (3-isocianatopropil) trietoxisilano (ICPTS) [159,254,255], bem como híbridos sem agentes [158,253,256,257], esses trabalhos utilizam formulações sem cálcio ou com cloreto/nitrato de cálcio para inserir esse metal na estrutura do vidro. No entanto, não foram encontrados relatos na literatura que utilizem Metoxietóxido de Cálcio (CME) como precursor.

A utilização de CME apresenta vantagens, como a eliminação da necessidade de tratamento térmico, comum em processos que utilizam nitratos, que seria inviável devido à degradação térmica do PVA. Além disso, o CME oferece uma melhor incorporação de

íons cálcio em comparação com os cloretos e nitratos, permitindo uma distribuição mais homogênea dos íons na matriz vítrea e melhorando as propriedades bioativas e estruturais do material [258].

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados neste estudo: água deionizada Milli-Q[®] (18,2 MΩ a 25 °C), tetraetilortosilicato (TEOS, Aldrich, 98 %), fosfato de trietila (TEP, Aldrich, ≥ 99,8 %), cálcio (grânulos, Aldrich, 99 %), 2-metoxietanol (anidro, Aldrich, 99,8 %), ácido nítrico (HNO₃, Anidrol, 65 %), pellets de PVA (Aldrich, Mw = 20.000-30.000 g.mol⁻¹, 88 % hidrolisado).

6.2.2. Preparação de Metoxietóxido de Cálcio (CME)

O CME foi preparado seguindo o método descrito por *Tallia et al.* [36], no qual 4 g de cálcio metálico (<1 cm, 99 %) foram reagidos com 96 ml de 2-metoxietanol anidro sob atmosfera de argônio a 80°C por 24 horas. Em seguida, a solução resultante foi centrifugada a 6.000 rpm por 15 minutos para remover o metal de cálcio não reagido. A concentração do CME foi mensurada transferindo-se 1 ml da solução para um cadinho de platina e aquecendo-a a 1.050°C por 12 horas, para evaporar todo o solvente e converter o CME em CaO. A concentração de CME na solução resultante foi então calculada como a razão entre a massa de CaO e a massa molecular do CaO.

6.2.3. Síntese do híbrido

O preparo da solução de PVA se iniciou com a mistura de água deionizada e ácido nítrico, ajustando o pH da solução para 2. Após a estabilização do pH desejado, a temperatura da solução foi gradualmente elevada até 60 °C, mantendo-se esta temperatura constante durante todo o processo. O PVA foi adicionado à solução sob agitação vigorosa, realizada por um agitador magnético de forma contínua e mantida por 1 hora, permitindo a completa dissolução e homogeneização do PVA com concentração final de 0,4 g.mL⁻¹.

Simultaneamente à preparação da solução de PVA, foi preparada uma solução de TEOS/TEP. Para isso, foi ajustado o pH da solução para 2, utilizando ácido nítrico como agente acidificante com a proporção molar de água para TEOS de 28:5. Inicialmente, adicionou-se o TEOS à água deionizada sob agitação constante e, em seguida, o TEP foi adicionado à mistura, continuando a agitação vigorosa por 30 minutos, permitindo uma hidrólise e pré-condensação adequadas do TEOS. Após este período, adicionou-se a solução de PVA previamente preparada à solução de TEOS e TEP, agitando-se por mais 30 minutos para garantir uma mistura homogênea. Finalmente, a solução de metoxietóxido de cálcio (CME) foi adicionada gota-a-gota à mistura sob agitação constante. Após atingir o estado gelatinoso, verteu-se a solução final em seringas para uso em um sistema de impressão 3D, e guardadas à $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$, evitando completa geleificação e envelhecimento. A composição da solução final possui proporção orgânica/inorgânica de 1:1 e a fase inorgânica segue a mesma proporção molar do VB 58S (60 % SiO_2 , 36 % CaO e 4 % P_2O_5).

6.2.4. Impressão 3D

A impressão da solução híbrida foi realizada com velocidade de deslocamento do cabeçote de impressão de $10\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, volume de deposição de $0,05\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, ponteira rosa (diâmetro 0,61 mm) e recuo entre camadas de 0,61 mm. O modelo 3D utilizado era do tipo caixa com preenchimento em grade, e distância de 1mm entre linhas de impressão, conforme a Figura 6.1. Após impressão o *scaffold* foi envelhecido à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 dias e seco por 24h à $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. A Figura 6.2 descreve a metodologia empregada.

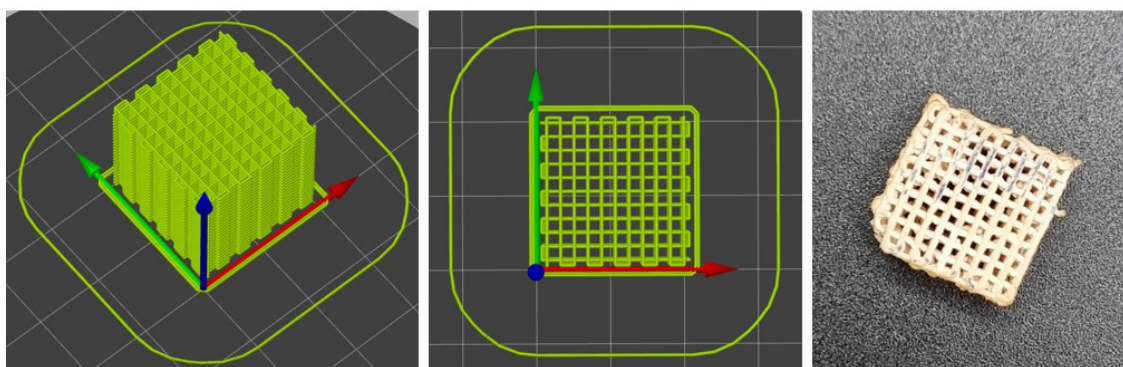


Figura 6.1 – Modelo 3D tipo caixa com preenchimento em grade utilizado na impressão dos *scaffolds* e peça pronta à direita

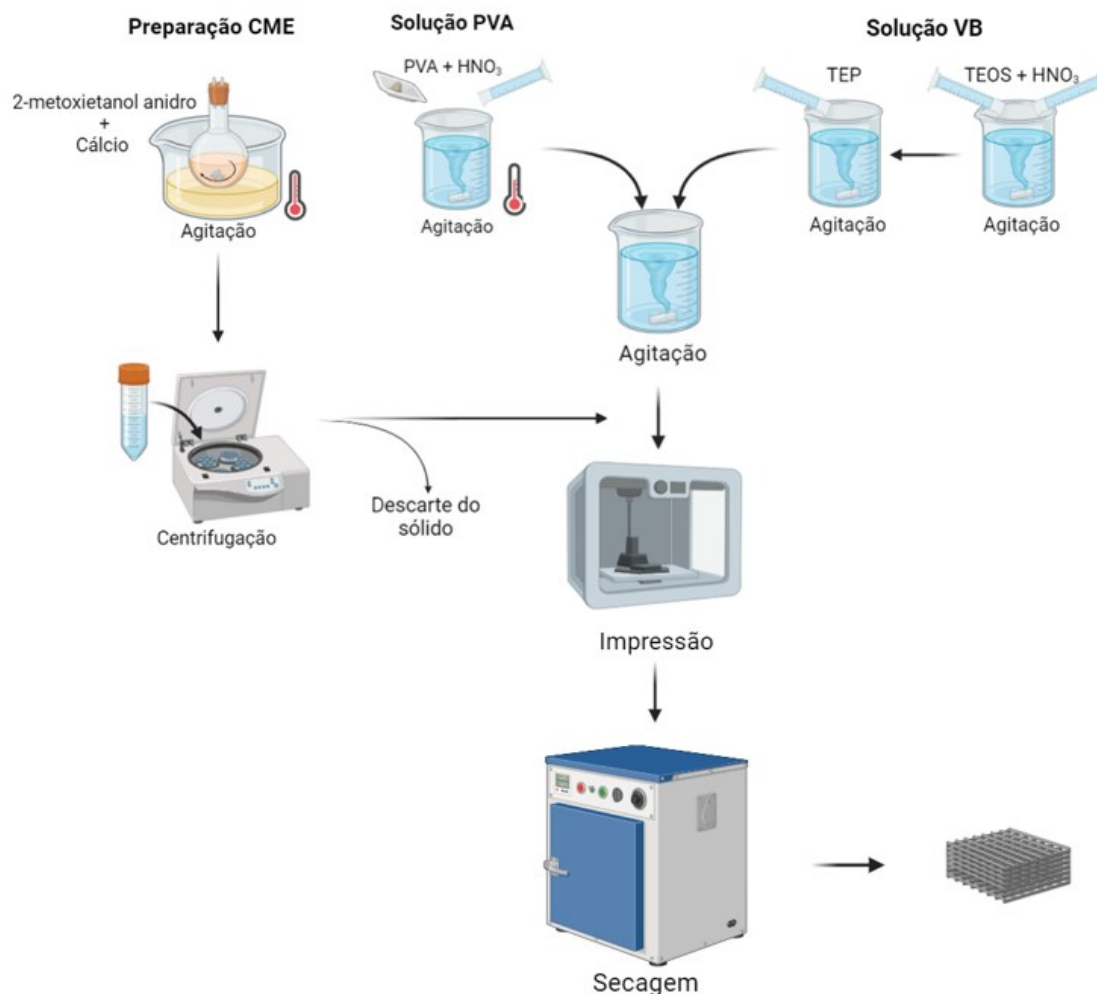


Figura 6.2 – Metodologia empregada na produção de *scaffolds* híbridos com CME por impressão 3D.

6.2.5. Caracterização Estrutural

A análise de DRX foi conduzida com um difratômetro Philips-PANalytical PW 1710, operando a 40 kV e 30 mA, com passo de 0,06° e radiação CuK α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). Os picos de difração obtidos foram comparados com a base JCPDS para identificar as fases cristalinas. A análise de FTIR foi realizada em um espectrômetro Bruker Alpha, equipado com ATR (refletância total atenuada) e cristal de diamante. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 128 varreduras, visando identificar as ligações químicas presentes nos materiais.

A análise de MEV foi realizada no microscópio Jeol JSM-6360LV, sob tensão de aceleração de 10 kV. Os *scaffolds* foram fraturados após imersão em nitrogênio líquido e fixados com fita de carbono dupla face. Todas as amostras foram revestidas com ouro em uma espessura de 10 nm por pulverização catódica antes da análise. A EDS foi realizada com sistemas NORAN acoplados aos microscópios, permitindo determinar a composição elementar.

A microtomografia computadorizada (micro-CT) foi realizada em um Bruker SkyScan 1174, com tensão de 50 kV, corrente de 800 μ A, filtro de alumínio de 0,5 mm e resolução de pixel de 10,03 μ m, possibilitando reconstruções tridimensionais das estruturas internas.

6.2.6. Bioatividade

A bioatividade foi avaliada em triplicata pela imersão de porções dos biomateriais em SBF (Simulated Body Fluid), conforme Kokubo e Takadama, em uma concentração de 1,5 g.L⁻¹ a 37 °C por até 14 dias. As amostras foram lavadas com álcool absoluto, secas ao ar a 40 °C por 24 horas, e caracterizadas por MEV, EDS, FTIR e DRX.

6.2.7. Viabilidade celular

A avaliação da citotoxicidade foi realizada de acordo com a norma ISO 10993-12 (Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos - Parte 12: Preparação de Amostras e Materiais de Referência) utilizando o método de extrato. Os *scaffolds* foram esterilizados sob luz ultravioleta (UV) por 4 horas e, em seguida, incubados em DMEM (10 g.L⁻¹) por 24 \pm 2 horas a 37 \pm 1 °C para obter o extrato líquido. O extrato obtido foi aplicado diretamente às células, substituindo o meio sem filtração.

Para avaliar o perfil de citotoxicidade *in vitro* das amostras preparadas, fibroblastos pulmonares fetais humanos (MRC-5) foram cultivados em frascos de cultura celular de 50 mL. O meio de cultura utilizado foi o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina. Esse meio consistia em DMEM contendo 4500 mg.L⁻¹ de glicose, 4 mM de glutamina, 11 mg.L⁻¹ de piruvato de sódio e 3,7 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio. As células foram incubadas a 37 °C em uma incubadora de CO₂ (Thermo 311) com uma atmosfera

controlada de 95% O₂, 5% CO₂ e 95% de umidade relativa. Após atingir a confluência adequada, aproximadamente 10⁸ células foram semeadas em placas de cultura celular de 12 poços contendo o extrato composto previamente preparado. As placas foram mantidas a 37 °C por 24 horas em uma incubadora de CO₂ para promover a adesão celular. Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos (n = 3 por grupo): (i) solução estéril de NaCl (0,9% p/v) como controle negativo; (ii) solução de DMSO (20%) como controle positivo; (iii) amostras de teste. Todos os ensaios de cultura celular e citometria de fluxo foram realizados em conformidade com as normas de biossegurança da ISO 10993-5 (Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos - Parte 5: Testes de Citotoxicidade In vitro). Esses experimentos foram realizados em triplicata, e 20.000 eventos foram registrados para cada amostra. Parâmetros como espalhamento lateral (SSC), espalhamento frontal (FSC) e emissões de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) foram incluídos nessas análises.

A caracterização morfológica das células tratadas foi investigada por microscopia óptica, conduzida em um microscópio Nexcope NIB620-FL. As células tratadas e os controles foram investigados para identificar padrões de citotoxicidade morfológica nas células estudadas, como apoptose precoce ou tardia, células em fase necrose.

Os resultados obtidos foram expressos pela média ± erro padrão da média. Os dados foram verificados quanto à normalidade por Shapiro-Wilk seguido de ANOVA e, quando $p < 0,05$ entre grupos, foi aplicado pós teste de Tukey.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Caracterização estrutural

As imagens de MEV apresentadas na Figura 6.3 revelaram uma estrutura com grande quantidade de vazios, essenciais para a penetração celular e a vascularização que favorecendo a integração do *scaffold* ao tecido ósseo. Observa-se uma superfície homogênea, sem diferenciação de fases em escala micrométrica, o que apoia a hipótese da formação de um híbrido tipo I.

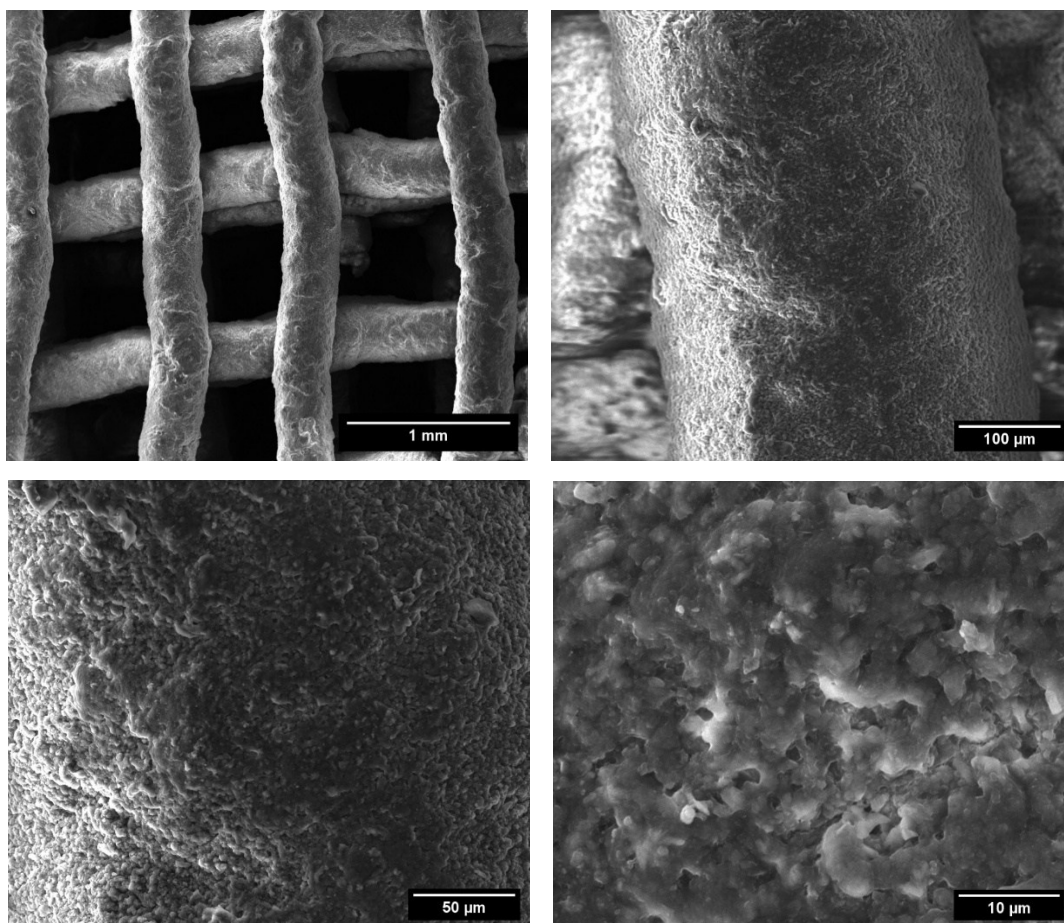


Figura 6.3 – Micrografias por MEV de *scaffolds* híbridos em diversos aumentos indicando a trama utilizada e a uniformidade da superfície sem fases distinguíveis em escala micrométrica.

À esquerda da Figura 6.4, observa-se a reconstrução 3D de um *scaffold*, enquanto à direita é apresentada a distribuição do espaçamento da trama. A análise da estrutura tridimensional por Micro-CT revelou uma arquitetura bem definida e uniforme, com diâmetro médio da trama de $256,7 \mu\text{m} \pm 96,2 \mu\text{m}$ e quantidade de vazios de $64,7 \pm 3,2\%$. Essas características são compatíveis com potenciais aplicações em terapias regenerativas para o tecido ósseo.

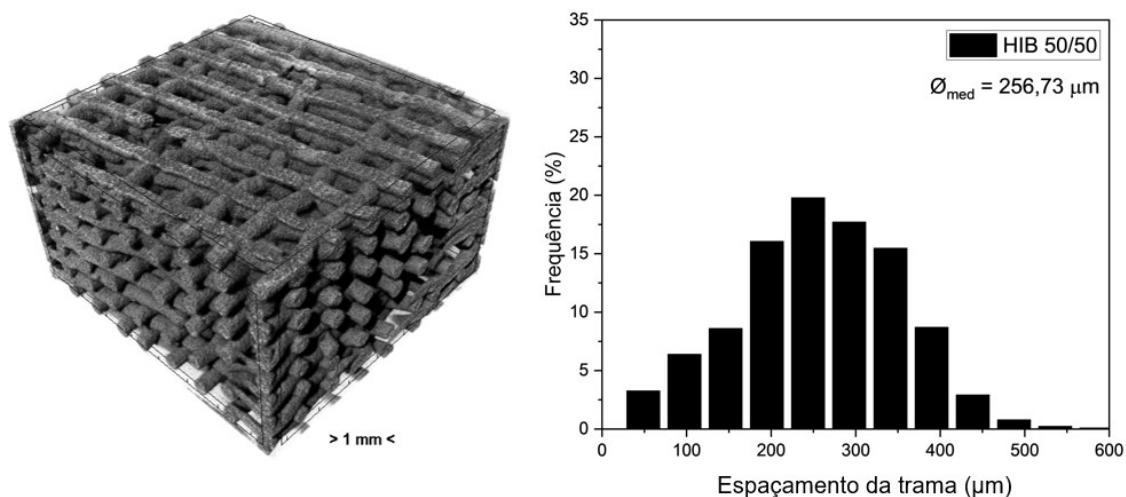


Figura 6.4 – Modelo 3D construído por Micro-CT à esquerda e distribuição de espaçamento da trama à direita.

A Figura 6.5 exibe os espectros normalizados das análises de FTIR de materiais componentes de um híbrido de TEOS e PVA na proporção de 50/50 (m/m %), sem a utilização de TEP e CME. A síntese sem os dois últimos componentes elimina a influência destes precursores e avalia a interferência do polímero na condensação da rede de sílica e entre as fases orgânica-inorgânica. Para o PVA, bandas em 2900 cm^{-1} indicam a presença de grupos $-\text{CH}_2$, e em 1700 cm^{-1} são referentes à $\text{C}=\text{O}$ da porção não hidrolisada do PVA e entre 100 e 1050 cm^{-1} , C-O-H [259,260]. No espectro do híbrido, as bandas de vibração Si-O-Si, entre 800 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} , indicam que a adição de PVA no processo sol-gel não impediu a condensação e a formação da rede de sílica. Bandas e na região em torno de 3300 cm^{-1} , observam-se bandas relacionadas a grupos OH. No vidro bioativo, essas bandas indicam as porções de silanol presentes na rede vítrea; no PVA, estão associadas às hidroxilas do polímero; e, no híbrido, podem indicar porções não reagidas durante o processo de condensação.

Espera-se que, após a mistura do TEOS hidrolisado com o PVA, o oxigênio da hidroxila do PVA ataque o silício do grupo silanol, que é eletrofílico devido à sua ligação com o oxigênio. Esse processo resulta na formação de uma ligação Si-O-C e na eliminação de uma molécula de água, criando um éter silílico ligado à cadeia do álcool.

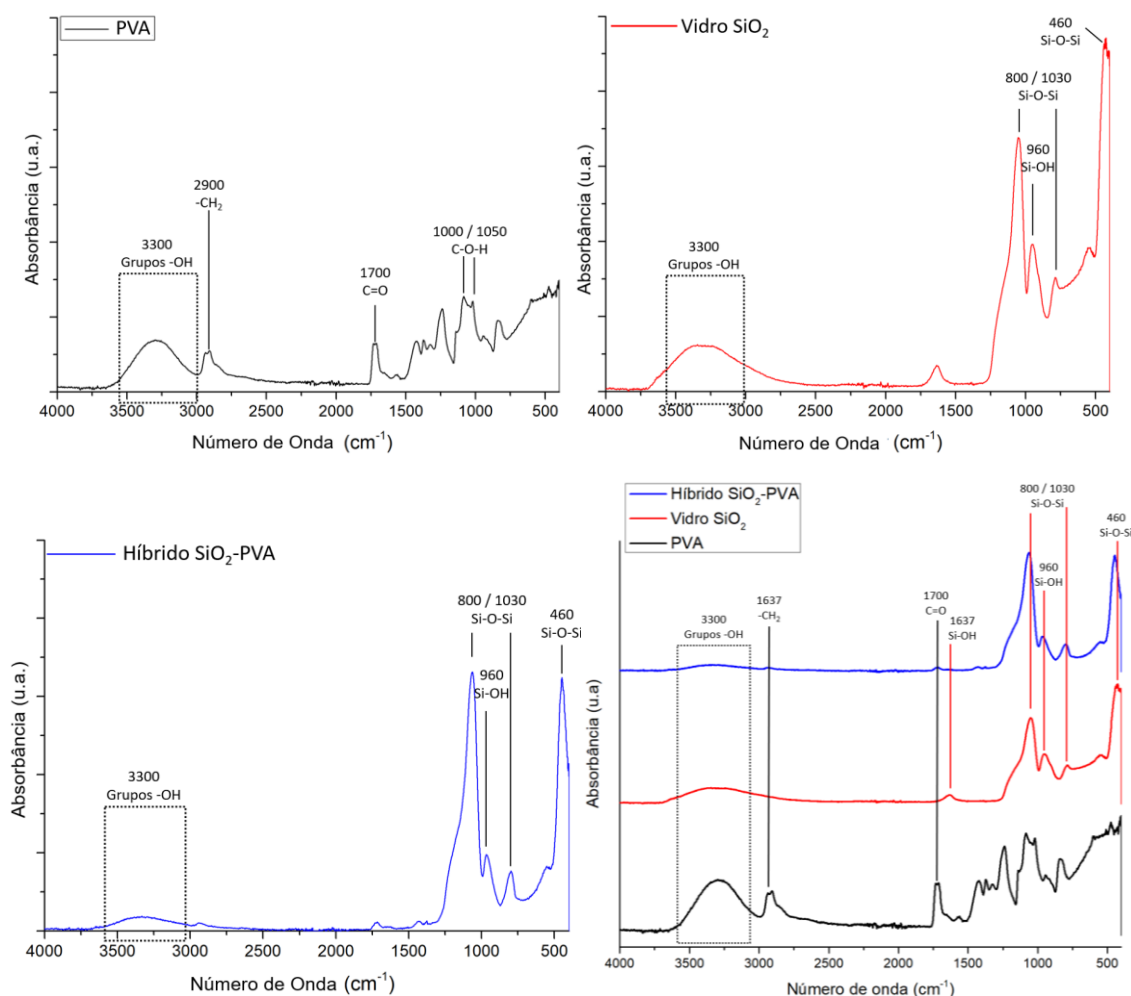


Figura 6.5 – Espectros de FTIR de vidro SiO₂, de PVA e do Híbrido desses dois componentes com proporção 50/50 m/m %.

Após a verificação da possibilidade de condensação com a adição de PVA no reação sol-gel do TEOS, TEP e CME foram adicionados para incorporação de fósforo e cálcio, respectivamente. O espectro de FTIR dessa amostra apresentado na Figura 6.6 exhibe diversas bandas que fornecem informações sobre a estrutura e as interações químicas no híbrido produzido via sol-gel. Algumas dessas bandas apresentam deslocamentos em relação às suas regiões de absorção originais, devido às interações entre os grupos funcionais identificados. As bandas e ombros localizados em 450, 1020 e 1330 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações de Si-O-Si na rede de sílica [198–201]. Essas bandas refletem a formação da estrutura siloxânica, resultante da hidrólise e condensação do TEOS, responsável por criar a rede tridimensional de sílica. Os ombros em 550, 600, 1140 e 1180 cm⁻¹ são características de deformações angulares e de estiramento das ligações P-O em grupos fosfato [261,262], sugerindo a interação entre o TEP e a matriz de sílica, além da

possível formação de ligações cruzadas entre as cadeias de polímeros e os grupos fosfato. A banda em 850 cm^{-1} corresponde aos modos vibracionais das ligações Si-O-2NBO associadas à presença de modificadores de rede na composição do vidro. O deslocamento desta banda em relação à região de absorção original, 820 cm^{-1} , sugere que a incorporação de íons Ca^{2+} no vidro ocorreu e deslocou a formação da rede de Si-O para NBOs, indicando o potencial de substituição de CME por nitrato de cálcio na formulação do vidro 58S [205,206]. A presença do ombro Si-OH deslocado de 960, para 940 cm^{-1} , é referente às porções hidrolisadas, mas não completamente condensadas do vidro; em 1630 cm^{-1} também estão relacionadas aos grupos silanol [202] e à água fisicamente adsorvida [203,263]. O Ombro em 1090 cm^{-1} , pode ser atribuído a deformações assimétricas de Si-O-C, o que sugere a presença de ligações químicas entre o silício e o carbono via oxigênio. Essas ligações covalentes indicam que houve uma reação entre o TEOS e o PVA, resultando na formação de um material híbrido organo-inorgânico por meio de condensação [257,264,265]. A banda em 1425 cm^{-1} está relacionada a grupos CO_3^{2-} [204] e em 1700 cm^{-1} , vibrações referentes a C=O estão presentes devido ao fato de o PVA não ser completamente hidrolisado [260].

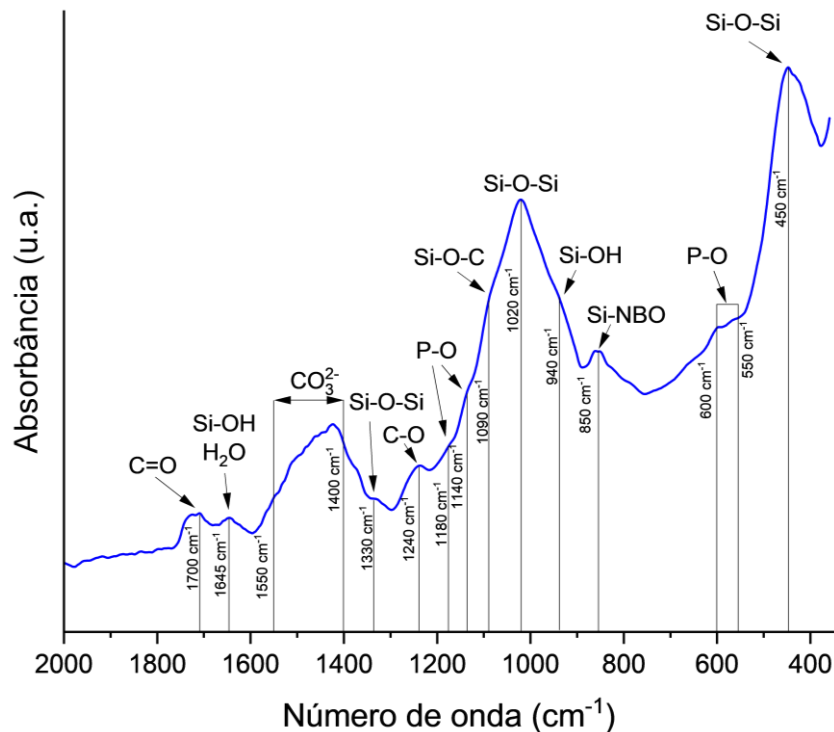


Figura 6.6 – Espectro de FTIR do híbrido com proporção 50/50 m/m % entre fases inorgânica de vidro 58S e orgânica de PVA

A região entre 1200 e 900 cm^{-1} está ampliada de deconvoluída, com $R = 0,999$, na Figura 6.7 e as curvas correspondentes estão sinalizadas com diferentes cores. Observa-se em 1020 cm^{-1} a banda de Si-O-Si, em 1090 cm^{-1} a banda Si-O-C e em 1140 cm^{-1} a banda de P-O, que correspondem a ombros no espectro do híbrido. Apesar do indício de ligações Si-O-C, mais análises químicas são necessárias para confirmar a classificação desse material como um híbrido tipo II. A ressonância magnética nuclear e o raman, são técnicas que poderiam sustentar melhor a hipótese de ligação química entre as fases.

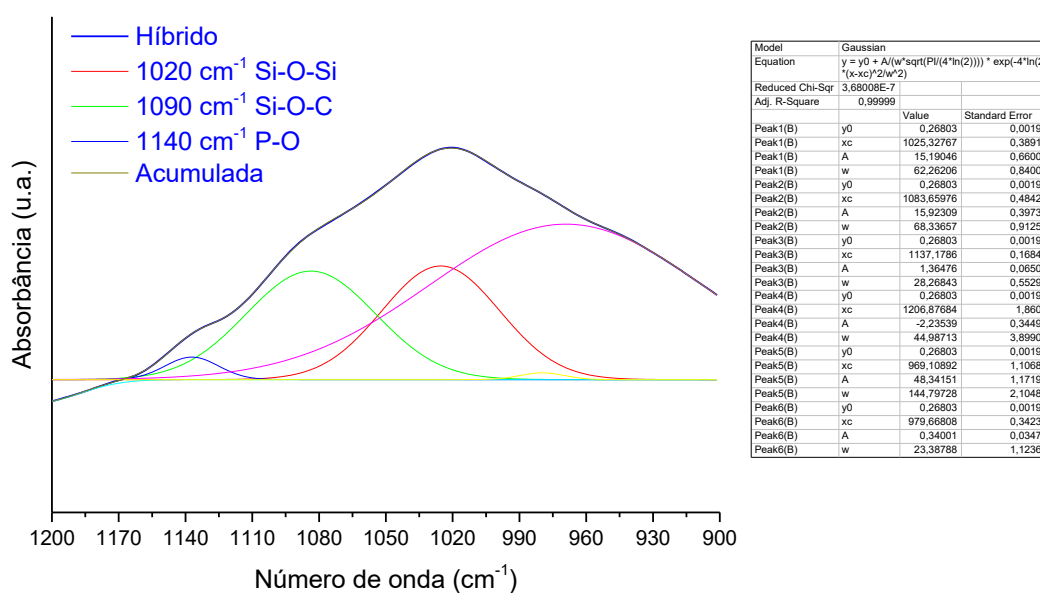


Figura 6.7 – Deconvolução da região entre 900 e 1200 cm^{-1} do FTIR do *scaffold* híbrido

Na Figura 6.8, a análise de EDS confirmou a presença de Si, Ca e P, elementos constituintes do VB 58S. O carbono presente se relaciona com a cadeia polimérica do PVA, enquanto o oxigênio observado provém de silanóis, ligações éter no híbrido e hidroxilas do polímero, além de carbonilas do PVA não hidrolisado. O silício e o fósforo detectados têm como precursores o TEOS e o TEP, respectivamente[266]. A presença de cálcio, proveniente do CME, indica que essa substância pode ser utilizada como precursor para incorporação desse íon em alternativa ao cloreto e nitrato de cálcio [258]. Esses resultados sugerem a manutenção da composição química do híbrido após o processo de impressão 3D.

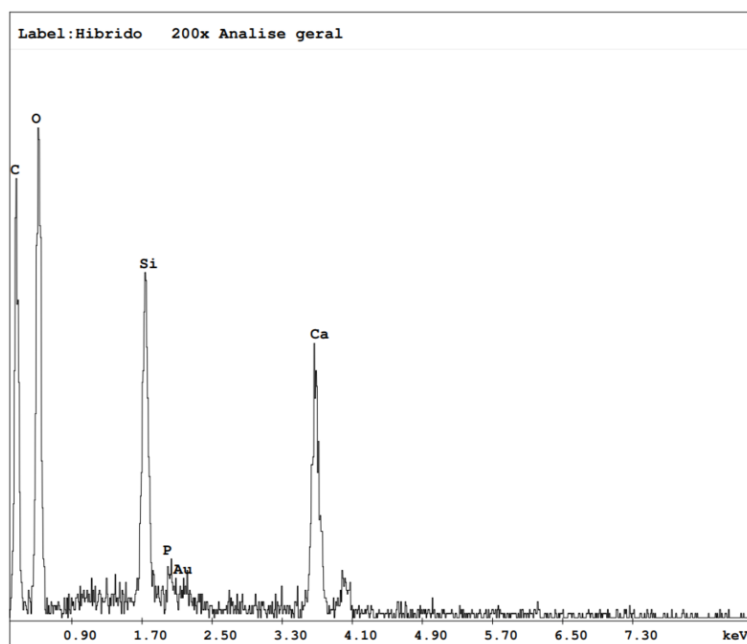


Figura 6.8 – EDS da superfície do *scaffold* recoberta por ouro, evidenciando a presença de cálcio e fósforo na composição.

6.3.2. Bioatividade

Após imersão em SBF por até 7 dias, o padrão de DRX, mostrado na Figura 6.9(a), evidenciou a formação de hidroxiapatita já nas primeiras 24 horas. Picos distintos de HAp foram identificados, de acordo com o JCPDS N° 09-0432, em ângulos 2θ de 26° , 32° , 34° e 46° , apresentando um aumento progressivo em intensidade, o que indica a formação crescente de fases de HAp. Em concordância com os padrões de DRX, o espectro de FTIR apresentado na Figura 6.9(b) revelou bandas características dos grupos PO_4^{3-} em 1020 cm^{-1} , 600 cm^{-1} e 560 cm^{-1} [17]. A presença dessas bandas é consistente com a literatura sobre vidros bioativos e indica o desenvolvimento de uma camada rica em HAp na superfície do material, evidenciando a bioatividade do *scaffold*. O aumento da intensidade dos picos com o tempo sugere que o material híbrido é altamente bioativo, promovendo a nucleação de fases biológicas ao entrar em contato com fluidos corporais.

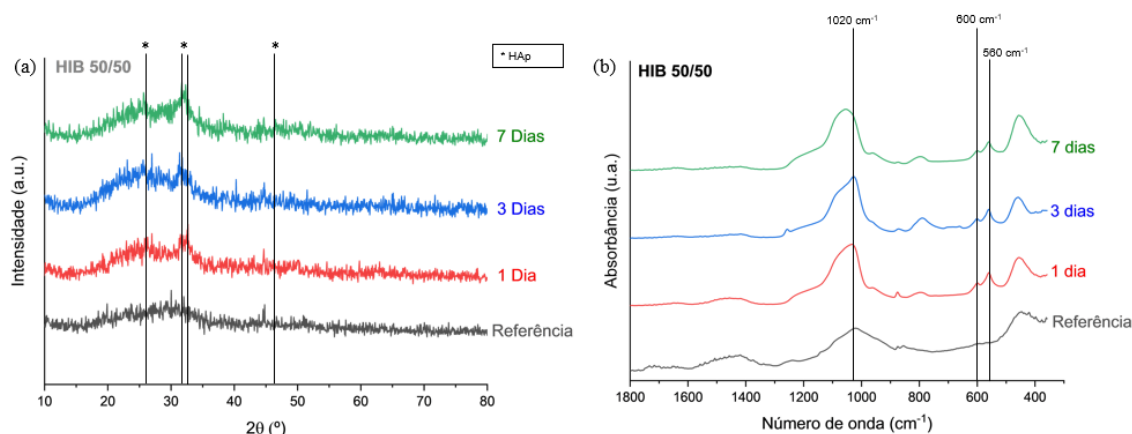


Figura 6.9 – Padrões de DRX de *scaffolds* híbridos em SBF à esquerda e espectros do mesmo material à direita evidenciando a presença de hidroxiapatita a partir das primeiras 24 em ambas análises

6.3.3. Viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular na Figura 6.10 mostram uma baixa taxa de citotoxicidade do material híbrido em comparação ao controle negativo, e os valores são apresentados na Tabela 6.1. A alta viabilidade celular (93,8 %) sugere que o material é compatível em termos biológicos, acima do limite inferior de 70% para que seja considerado citotóxico. As células MRC-5 são bastante sensíveis à altas concentrações de íons e pH [267], a interação entre a fase orgânica com o vidro possivelmente controlou a dissolução desses íons no meio aquoso, e evitou a morte celular e está próxima de valores encontrados na literatura para ensaios de viabilidade de células da linhagem MRC-5 (92.12%) com materiais híbridos de vidro bioativo e polímeros [268]. Ensaio de ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry poderia ajudar na determinação da concentração de íons e elucidar sobre a taxa de liberação existente em híbridos e compósitos quando em meio aquoso.

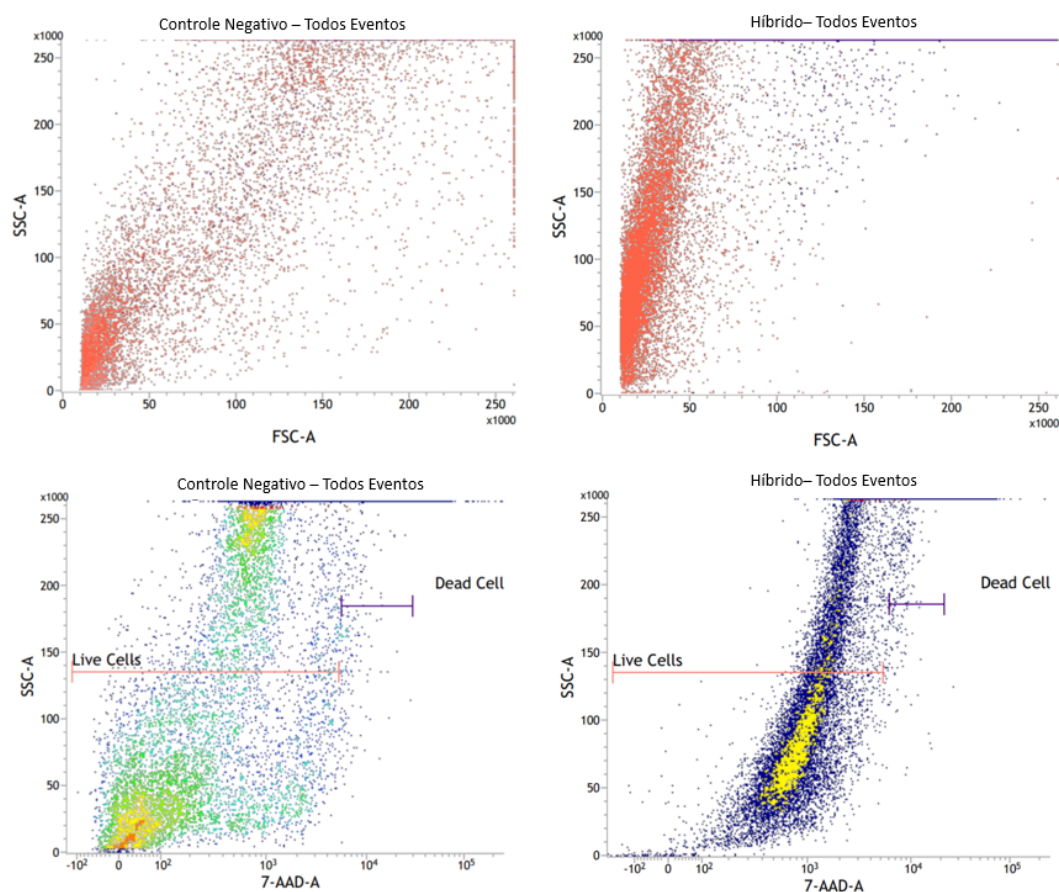


Figura 6.10 – Painéis de citometria de fluxo do controle negativo e de *scaffolds* híbridos

Tabela 6.1 – Viabilidade celular em contato com extrato híbrido

| | Amostra | Viabilidade celular (%) |
|-----------------------|------------|-------------------------|
| Grupo controle | Controle - | 88,5 ± 0,2* |
| Híbrido | 50/50 | 93,8 ± 0,3* |

A Figura 6.11 mostra uma micrografia de cultivo de células MRC-5 em extrato do material híbrido em que se observa um recobrimento total do substrato e alta confluência celular na presença do material sintetizado. A maioria das células exibe o formato fusiforme característico da linhagem, enquanto poucas células arredondadas foram observadas se desprendendo do fundo do frasco de cultivo. Esses resultados corroboram os dados da citometria de fluxo, que indicam que mais de 90 % das células são viáveis.

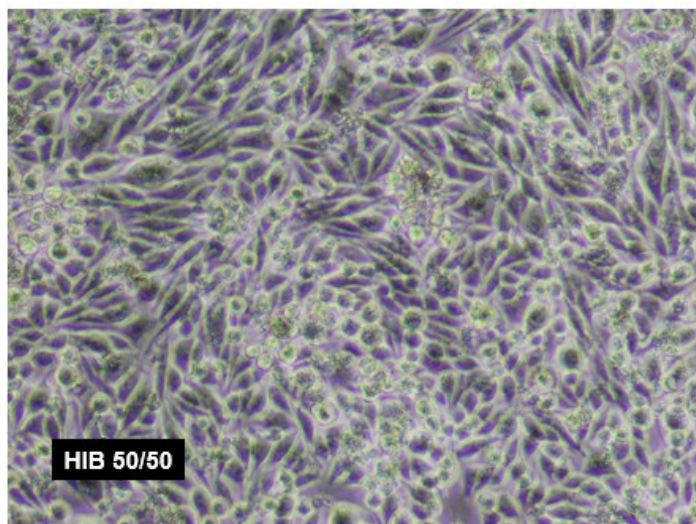


Figura 6.11 – Microscopia óptica de culturas em extratos do material híbrido apresentando alta confluência e morfologia característica da linhagem

6.4. CONCLUSÃO

O material híbrido foi sintetizado com proporção 50/50 em massa de vidro derivado do 58S e PVA e adição do polímero durante o processo sol-gel não impediu a condensação da rede de sílica conforme sugere o FTIR. As análises de FTIR e EDS revelaram a presença dos elementos constituintes do vidro bioativo, como silício, cálcio e fósforo, sugerindo que após impressão 3D o material preservou a composição química do híbrido, garantindo suas propriedades desejadas. Além disso, a utilização do CME como alternativa ao cloreto e nitrato de cálcio se mostrou efetiva conforme a presença do metal em EDS.

As micrografias mostraram uma estrutura sólida e homogênea, sem a presença de fases distintas em escala micrométrica, confirmando a formação mínima para classificação como híbrido tipo I.

Embora a banda de Si-O-C do FTIR sugerir condensação entre a rede de sílica e o polímero, ainda restam porções não reagidas encontradas nas bandas referentes à -OH. Este comportamento está alinhado com o mecanismo esperado de condensação entre o TEOS hidrolisado e o PVA, resultando em ligações Si-O-C e na eliminação de moléculas de água. Entretanto, estudos complementares como RMN, Raman e ICP-EOS podem ser

feitos para determinar a estrutura química do material e o comportamento de liberação de íons, além de avaliar se o material se trata de um híbrido tipo II.

O *scaffold* final apresenta uma estrutura altamente interconectada, com uma distribuição uniforme de espaçamento de trama e média de $256 \mu\text{m} \pm 96 \mu\text{m}$, além de uma taxa de vazios de $64,7 \pm 3,2\%$, o que é compatível com os requisitos para regeneração óssea ($> 50\%$).

A formação de hidroxiapatita (HA) nas primeiras 24 horas de imersão indica um alto potencial de bioatividade. Além disso, o contato do cultivo celular com extratos do material demonstrou baixa citotoxicidade, com uma alta taxa de células viáveis ($93,8 \pm 0,3$), acima do patamar mínimo de 70% determinado pela ISSO 10993-12. Estudos futuros poderão focar na otimização das condições de síntese para promover a formação de ligações covalentes entre as fases orgânicas e inorgânicas, bem como na avaliação do comportamento mecânico do material, a fim de confirmar seu desempenho em longo prazo.

7. CONCLUSÕES FINAIS

7.1. COMPARAÇÃO ENTRE AS ROTAS

7.1.1. Propriedades Mecânicas

Os *scaffolds* fabricados por *freeze-casting* apresentam resistência mecânica que varia conforme a proporção entre as fases. Para os *scaffolds* cerâmicos 58S/13-93, uma maior fração de 13-93 resultou em maiores resistências mecânicas à compressão e módulos de Young. A baixa T_g deste vidro possibilitou o fluxo viscoso à temperatura de 650 °C, sinterizando a estrutura e aglomerando as partículas de vidro 58S [269].

No processo de fabricação de *scaffolds* cerâmico-poliméricos por *freeze-casting*, observou-se um aumento das propriedades mecânicas do *scaffold* com o incremento da carga polimérica. O longo tamanho de cadeia do PVA cria emaranhamentos entre as partículas cerâmicas, sustentando a estrutura do *scaffold* mesmo sem sinterização contribuindo para uma distribuição homogênea das cargas e retardando a propagação de trincas [38,270]. A Tabela 7.1 apresenta uma comparação e a relação entre as proporções das fases e as propriedades mecânicas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas para $p < 0,05$.

Tabela 7.1 – Comparação entre fases do material e propriedades mecânicas.

| Amostras | Resistência à compressão (MPa) | Módulo de Young (GPa) | Tenacidade ($\times 10^6$ J.m ⁻³) | |
|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--|-------------------------------|
| Scaffolds 58S/13-93 | 30/70 | 11,3 \pm 2,5 ^a | 0,8 \pm 0,3 ^a | - |
| | 50/50 | 4,7 \pm 0,5 ^b | 0,4 \pm 0,1 ^b | - |
| | 70/30 | 3,8 \pm 1,8 ^b | 0,3 \pm 0,1 ^b | - |
| Scaffolds 58S/PVA | 80/20 | 16,7 \pm 3,0 ^c | 0,2 \pm 0,1 ^b | 154,0 \pm 15,8 ^a |
| | 90/10 | 11,4 \pm 0,5 ^a | 0,1 \pm 0,1 ^c | 86,5 \pm 8,3 ^b |
| | 95/05 | 2,0 \pm 0,3 ^d | 0,1 \pm 0,1 ^d | 15,0 \pm 2,6 ^c |

Dentre as amostras analisadas, todas possuem resistência a compressão mínima e módulo de Young compatíveis com o osso trabecular humano (2,0 a 12,0 MPa e 0,01 a 3,0 GPa, respectivamente) [56,214]. Entretanto, observa-se que os *scaffolds* cerâmicos possuem maiores módulos de Young, enquanto os cerâmico-poliméricos apresentam a maior

resistência à compressão o que direciona os cerâmicos em situações nas quais o *stress shielding* é mais decisivo e os poliméricos para situações de suporte de carga e confiabilidade [271]. Os valores encontrados para amostras fabricadas por *freeze-casting* se aproximam daqueles encontrados na literatura para compósitos de vidros e polímeros de acordo com a Tabela 7.2

Tabela 7.2 – Valores de resistência mecânica de *scaffolds* compósitos de vidro bioativo e polímeros processados por *freeze-casting* e impressão 3D.

| Materiais | Processamento | Resistência compressão (MPa) | Módulo de Elasticidade (GPa) | Módulo de tenacidade (MPa) |
|--|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Vidro Bioativo/HDPE [272] | Impressão 3D | 25,4 | 1,8 | 12,5 |
| Vidro Bioativo/Gelatina/Alginato [273] | Impressão 3D | 30,0 | 2,5 | 15,0 |
| Vidro Bioativo/PCL [274] | Impressão 3D | 20,0 | 1,5 | 10,0 |
| Vidro Bioativo/Compósito [275] | <i>Freeze-casting</i> | 18,0 | 1,2 | 8,0 |
| Vidro Bioativo/PVA [275] | <i>Freeze-casting</i> | 19,0 | 1,4 | 9,0 |

7.1.2. Morfologia de Poros

A morfologia dos poros é um fator crítico para a regeneração óssea, pois influencia diretamente a infiltração celular, a vascularização e a taxa de degradação do *scaffold*. Os *scaffolds* cerâmicos não apresentaram diferença de porosidade significativa com a variação de proporção entre vidros 58S/13-93. Além disso, observou-se uma alta relação entre poros abertos e fechados em todas as amostras, o que pode ser atribuído à capacidade do solvente de afastar as partículas durante o congelamento, devido à baixa viscosidade da solução. Esse comportamento justifica a morfologia lamelar observada nos *scaffolds* liofilizados.

No processo de *freeze-casting* para amostras cerâmico-poliméricas, a alta viscosidade da solução impediu o congelamento do solvente da mesma forma que ocorre no processo somente com carga cerâmica. A concentração da solução afeta diretamente a morfologia dos poros; neste caso, a alta carga de PVA com longas cadeias restringiu o movimento das partículas além de obstruir defeitos e poros do material durante o processamento,

resultando na diminuição do volume de total poros, aumentando a proporção de poros fechados/abertos e produzindo morfologias diferentes da lamelar, característico da água.

Nos *scaffolds* produzidos por impressão 3D, o processo de envelhecimento e secagem resultou na perda significativa de líquido, o que causou uma contração da estrutura final. Apesar de o formato de preenchimento e a espessura das linhas terem sido calculados para criar uma quantidade maior do que a observada, a morfologia dos poros foi preservada conforme a original no momento da impressão.

Apesar das diferenças nos processos, proporções entre as fases e naturezas dos componentes, todos os *scaffolds* apresentaram porosidade superior a 60 %, indicando seu potencial para aplicação em engenharia de tecidos. A comparação entre as porosidades das diferentes rotas de fabricação pode ser avaliada na Tabela 7.3, e a morfologia dos poros é ilustrada na Figura 7.1. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$

Tabela 7.3 – Porosidades das rotas trabalhadas e diâmetro médio de poros.

| Amostras | | Porosidade fechada (%) | Porosidade aberta (%) | Porosidade total (%) | Diâmetro médio de poros (μm) |
|----------------------------|-------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|
| Scaffolds 58S/13-93 | 30/70 | 6,2 \pm 3,6 ^a | 63,9 \pm 5,8 ^a | 70,1 \pm 2,4 ^a | 104,8 \pm 39,3 ^a |
| | 50/50 | 4,8 \pm 2,4 ^a | 68,5 \pm 2,6 ^a | 73,3 \pm 4,9 ^a | 95,4 \pm 35,8 ^a |
| | 70/30 | 6,6 \pm 2,9 ^a | 69,8 \pm 4,9 ^a | 76,3 \pm 2,6 ^a | 98,0 \pm 36,7 ^a |
| Scaffolds 58S/PVA | 80/20 | 27,8 \pm 5,2 ^b | 41,7 \pm 9,7 ^b | 69,5 \pm 5,1 ^a | 63,7 \pm 23,9 ^a |
| | 90/10 | 17,4 \pm 1,9 ^c | 57,1 \pm 5,5 ^c | 74,5 \pm 3,6 ^a | 83,2 \pm 31,2 ^a |
| | 95/05 | 6,1 \pm 1,2 ^a | 68,9 \pm 6,4 ^a | 75,0 \pm 7,1 ^a | 102,4 \pm 38,4 ^a |
| Scaffold Híbrido | 50/50 | - | - | 64,7 \pm 3,2 ^b | 256,7 \pm 96,2 ^b |

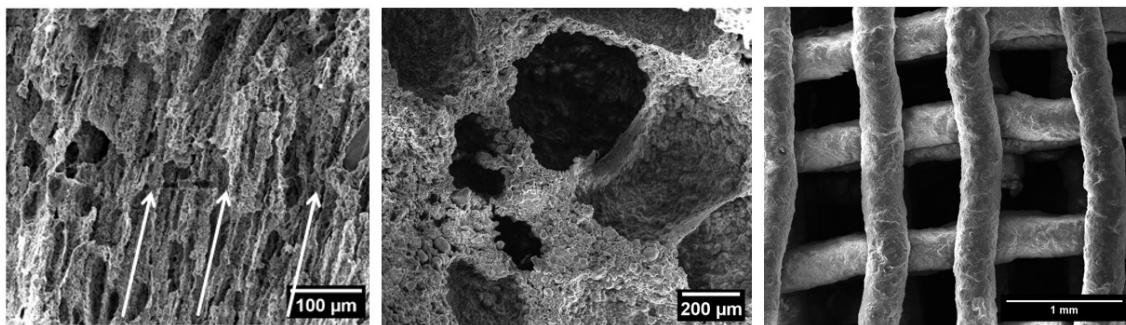


Figura 7.1 – Morfologia de poros evidenciando o resultado direto do congelamento ou processo de impressão.

7.1.3. Bioatividade

A bioatividade dos *scaffolds* foi avaliada por imersão em SBF por períodos iguais para todas as amostras deste trabalho. Em *scaffolds* cerâmicos mistos de 58S/13-93, a formação de HA ocorreu mais rapidamente do que em *scaffolds* puros de 13-93 em estudos anteriores [276]. Para os *scaffolds* produzidos por *freeze-casting*, o teor de 58S foi determinante para a velocidade de formação de HA, que aumentou com a proporção deste vidro devido à sua alta área superficial específica e taxa de dissolução[277]. O *scaffold* híbrido apresentou desempenho semelhante aos compostos cerâmicos, formando HA em menos de 24 horas de imersão. Seus picos no padrão de DRX e bandas no espectro de FTIR foram mais intensos e definidos que em todas as outras amostras, sendo considerado o de maior bioatividade.

Tabela 7.4 - Tempo de formação da camada de HA para os *scaffolds* desenvolvidos neste trabalho.

| Amostras | Tempo de formação HA | |
|----------------------------|----------------------|--------|
| Scaffolds 58S/13-93 | 30/70 | 1 dia |
| | 50/50 | 1 dia |
| | 70/30 | 1 dia |
| Scaffolds 58S/PVA | 80/20 | 3 dias |
| | 90/10 | 3 dias |
| | 95/05 | 1 dia |
| Scaffold Híbrido | 50/50 | 1 dia* |

7.1.4. Viabilidade Celular

A citotoxicidade foi avaliada por citometria de fluxo e microscopia óptica em cultivo de células MRC-5 com extrato dos materiais. Para os *scaffolds* cerâmicos, maiores proporções de vidro 58S resultaram em maior viabilidade celular. No entanto, essa tendência se inverteu nos compósitos 58S/PVA. A viabilidade celular é um parâmetro multifatorial que depende da rugosidade, química e caráter hidrofílico da superfície, bem como dos íons e resíduos liberados em meio aquoso [160,250,277]. O *scaffold* híbrido apresentou a maior viabilidade celular, provavelmente devido à taxa de dissolução do vidro sob condições diferentes daquelas dos compósitos. Apesar da variação dessas características entre as amostras, todas as análises mostraram alta viabilidade celular, superior a 70 %, indicando que os materiais não apresentam toxicidade, conforme a Tabela 7.5. A morfologia celular também foi preservada, com alta confluência observada por microscopia óptica para todas as amostras. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$.

Tabela 7.5 – Viabilidade celular de meios de cultivos em contato com extratos dos materiais examinados.

| Amostras | Viabilidade celular (%) | |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| | 30/70 | 88,1 ± 0,3 ^{ac} |
| Scaffolds 58S/13-93 | 50/50 | 83,1 ± 0,3 ^a |
| | 70/30 | 83,6 ± 0,3 ^a |
| | 80/20 | 83,3 ± 0,3 ^a |
| Scaffolds 58S/PVA | 90/10 | 73,3 ± 0,4 ^b |
| | 95/05 | 71,1 ± 0,4 ^b |
| | Scaffold Híbrido | 50/50 |

7.2. CONCLUSÕES GERAIS

A síntese das partículas mesoporosas de 58S pelo método sol-gel foi bem-sucedida, resultando em partículas com características estruturais típicas de materiais bioativos, como alta área superficial específica e porosidade adequada.

A síntese das partículas de vidro 13-93 também foi realizada com sucesso, com o material exibindo baixa tendência à cristalização devido à sua composição. Isso permitiu a sinterização dos *scaffolds* a temperaturas mais baixas sem perda significativa de bioatividade. Após sinterização dos *scaffolds* cerâmicos, as partículas permaneceram amorfas indicando sucesso no emprego do vidro 13-93 para reduzir a temperatura de sinterização de 1250 °C do vidro 58S puro para 650 °C.

Os *scaffolds* produzidos por *freeze-casting* e impressão 3D apresentaram porosidade controlada e interconectividade, favorecendo a infiltração celular e a vascularização, características essenciais para a regeneração óssea. A variação nas proporções de 58S, 13-93 e PVA resultou em diferentes perfis de porosidade e resistência mecânica.

A síntese dos *scaffolds* híbridos de 58S e PVA via sol-gel foi eficaz, produzindo um material com estrutura homogênea e bem integrada e a adição de PVA ao vidro bioativo 58S não impediu a formação da rede de sílica e manteve as propriedades biológicas do material.

Todos os *scaffolds* testados demonstraram boa bioatividade, muitos com formação de hidroxiapatita observada nas primeiras 24 horas de imersão em SBF.

Os testes de citotoxicidade mostraram alta biocompatibilidade, com baixa citotoxicidade e viabilidade celular superior a 80 %. A microscopia óptica revelou alta confluência celular e morfologia característica de células saudáveis.

7.3. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para trabalhos futuros, é possível citar:

- Otimizar parâmetros do processo sol-gel para maximizar a quantidade e ligações covalentes em híbridos VB-PVA.
- Utilizar agentes funcionalizadores de superfície e ligantes como (3-glicidoxipropil) trimetoxissilano (GPTMS), (3-isocianatopropil) trietoxissilano (ICPTS).
- Caracterizar a estrutura química do material híbrido por ressonância magnética nuclear (NMR) para compreender melhor as ligações presentes e o papel do CME e PVA no processo sol-gel.
- Avaliar a resistência mecânica e o desempenho estrutural de diferentes formatos e padrões de preenchimento em *scaffolds* produzidos por impressão 3D.
- Determinar a taxa de liberação de íons e degradação dos *scaffolds* em solução salina tamponada com fosfato (PBS), especialmente a diferença entre os compósitos e o material híbrido.

7.4. CONTRIBUIÇÕES PARA LITERATURA

Artigos submetidos em periódicos científicos:

SANTOS, D.M.M.; OLIVEIRA, G.L.; SOARES, D.C.F.; MAIA, M.V.; TALLIA, F.; HEYRAUD, A.; JONES, J.J.; HOUMARD, M.; NUNES, E.H.M. “Preparation of freeze-cast *scaffolds* from 58s and 13-93 sol-gel bioactive glasses for bone tissue engineering applications”. Non-crystalline solids.

SANTOS, D.M.M.; OLIVEIRA, G.L.; SOARES, D.C.F.; MAIA, M.V.; HEYRAUD, A.; TALLIA, F.; JONES, J.J.; HOUMARD, M.; NUNES, E.H.M. “Room temperature fabrication of freeze-cast 58s bioactive glass / polyvinyl alcohol composite *scaffolds* for bone tissue engineering”. Non-crystalline solid.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] IBGE, Esperança de vida ao nascer, <https://Cidades.Ibge.Gov.Br/Brasil/Pesquisa/53/49645?Tipo=grafico&indicador=49649> (2024).
<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/53/49645?tipo=grafico&indicador=49649> (accessed August 20, 2024).
- [2] WHO | Physical activity, WHO (2017).
- [3] Y.M. Dinçel, Bone graft types, in: R. Kummoona (Ed.), *Bone Grafting*, IntechOpen, Rijeka, 2018: pp. 27–39. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79449>.
- [4] R.J. Miron, Optimized bone grafting, *Periodontol 2000* 94 (2024) 143–160. <https://doi.org/10.1111/prd.12517>.
- [5] C.E. Gillman, A.C. Jayasuriya, FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration, *Materials Science and Engineering: C* 130 (2021) 112466. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112466>.
- [6] M.J. Meagher, H.E. Weiss-Bilka, M.E. Best, J.D. Boerckel, D.R. Wagner, R.K. Roeder, Acellular hydroxyapatite-collagen scaffolds support angiogenesis and osteogenic gene expression in an ectopic murine model: Effects of hydroxyapatite volume fraction, *J Biomed Mater Res A* 104 (2016) 2178–2188. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35760>.
- [7] A.D. Gomes, D.M.M. dos Santos, M.R. Dumont, M. Houmard, A.A.R. de Oliveira, E.H.M. Nunes, Preparation of hydroxyapatite/bioactive glass/collagen scaffolds for use in tissue engineering, *J Non Cryst Solids* 616 (2023) 122492. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2023.122492>.
- [8] L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kolahreez, S. Ramakrishna, D. Williams, Key terminology in biomaterials and biocompatibility, *Curr Opin Biomed Eng* 10 (2019) 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.02.004>.
- [9] Biomaterials Market Size to Hit USD 523.75 Billion by 2034, (2024). <https://www.precedenceresearch.com/biomaterials-market> (accessed September 12, 2024).
- [10] V.C. Costa, H.S. Costa, W.L. Vasconcelos, M.D.M. Pereira, R.L. Oréfice, H.S. Mansur, Preparation of hybrid biomaterials for bone tissue engineering, *Materials Research* 10 (2007) 21–26. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392007000100006>.

- [11] R.Lambert. Oréface, M. de M. Pereira, H.Sander. Mansur, Biomateriais : fundamentos e aplicações., 1st ed., Grupo Gen - Guanabara Koogan, 2012.
- [12] P. Jayabalan, A.R. Tan, M.N. Rahaman, B.S. Bal, C.T. Hung, J.L. Cook, Bioactive glass 13-93 as a subchondral substrate for tissue-engineered osteochondral constructs: A pilot study, *Clin Orthop Relat Res* 469 (2011) 2754–2763. <https://doi.org/10.1007/s11999-011-1818-x>.
- [13] Q. Nawaz, A. de Pablos-Martín, J. Martins de Souza e Silva, L. Berthold, K. Hurle, A.T. Contreras Jaimes, M. Sitarz, D.S. Brauer, A.R. Boccaccini, Crystallization study of sol-gel derived 13-93 bioactive glass powder, *J Eur Ceram Soc* 41 (2021) 1695–1706. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2020.09.052>.
- [14] B.D. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons, *Biomaterials science : an introduction to materials in medicine*, 3rd ed., Academic Press, 2013.
- [15] X. Liu, M.N. Rahaman, Q. Fu, Oriented bioactive glass (13-93) scaffolds with controllable pore size by unidirectional freezing of camphene-based suspensions: Microstructure and mechanical response, *Acta Biomater* 7 (2011) 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.025>.
- [16] G. Cidonio, M. Glinka, J.I. Dawson, R.O.C. Oreffo, The cell in the ink: Improving biofabrication by printing stem cells for skeletal regenerative medicine, *Biomaterials* 209 (2019) 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.04.009>.
- [17] R. Langer, Biomaterials: Status, challenges, and perspectives, *AIChE Journal* 46 (2000) 1286–1289. <https://doi.org/10.1002/aic.690460702>.
- [18] D.W. Hutmacher, *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*, 2000.
- [19] E. Marin, F. Boschetto, G. Pezzotti, Biomaterials and biocompatibility: An historical overview, *J Biomed Mater Res A* 108 (2020) 1617–1633. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36930>.
- [20] L.J. Locht, M.O. Pedersen, S. Markholt, B.M. Bibby, A. Larsen, M. Penkowa, M. Stoltenberg, J. Rungby, Metallic silver fragments cause massive tissue loss in the mouse brain, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 109 (2011) 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00668.x>.
- [21] K.R. Pereira, *Avaliação Da Biocompatibilidade in Vitro E in Vivo De Ligas Metálicas De Titânio Para Aplicação Odontológica*, 2008.
- [22] L.J. Locht, M.O. Pedersen, S. Markholt, B.M. Bibby, A. Larsen, M. Penkowa, M. Stoltenberg, J. Rungby, Metallic silver fragments cause massive tissue loss in the

- mouse brain, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 109 (2011) 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00668.x>.
- [23] A. Spoială, C.-I. Ilie, D. Ficai, A. Ficai, *Biomaterials*, (2023) 97–129. https://doi.org/10.1007/978-3-031-35832-6_4.
- [24] N.T.C. Oliveira, V. Perrotti, A. Palmieri, A.C. Guastaldi, A. Pellati, C.L. Scapin, A. Piattelli, F. Carinci, *Journal of osseointegration.*, Scopus (2011) 10–16.
- [25] L.L. Hench, *Bioceramics, Stress The International Journal on the Biology of Stress* 28 (1998) 1705–1728. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02540.x>.
- [26] R.S. Katari, A. Peloso, G. Orlando, *Tissue engineering, Adv Surg* 48 (2014) 137–154. <https://doi.org/10.1016/j.yasu.2014.05.007>.
- [27] H. Fouad, Effects of the bone-plate material and the presence of a gap between the fractured bone and plate on the predicted stresses at the fractured bone, *Med Eng Phys* 32 (2010) 783–789. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2010.05.003>.
- [28] P. Cao, J. Jeyabalan, F. Aqil, S. Ravoori, R.C. Gupta, M. V. Vadhanam, Polymeric implants for the delivery of green tea polyphenols, *J Pharm Sci* 103 (2014) 945–951. <https://doi.org/10.1002/jps.23864>.
- [29] N. Siddiqui, S. Asawa, B. Birru, R. Baadhe, S. Rao, PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications, *Mol Biotechnol* 60 (2018) 506–532. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0084-5>.
- [30] P. Cao, J. Jeyabalan, F. Aqil, S. Ravoori, R.C. Gupta, M. V. Vadhanam, Polymeric implants for the delivery of green tea polyphenols, *J Pharm Sci* 103 (2014) 945–951. <https://doi.org/10.1002/jps.23864>.
- [31] N. Siddiqui, S. Asawa, B. Birru, R. Baadhe, S. Rao, PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications, *Mol Biotechnol* 60 (2018) 506–532. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0084-5>.
- [32] X. Hu, S. Li, Z. He, X. Li, X. Wang, Flexible biopolymer-assisted 3D printed bioceramics scaffold with high shape adaptability, *Int J Biol Macromol* 265 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130919>.
- [33] P. Fabbri, V. Cannillo, A. Sola, A. Dorigato, F. Chiellini, Highly porous polycaprolactone-45S5 Bioglass® scaffolds for bone tissue engineering, *Compos Sci Technol* 70 (2010) 1869–1878. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2010.05.029>.

- [34] M.A. Woodruff, D.W. Hutmacher, The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science (Oxford)* 35 (2010) 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>.
- [35] K. Kumar, B.S. Babu, eds., *Hybrid Composites*, De Gruyter, 2022. <https://doi.org/10.1515/9783110724684>.
- [36] F. Tallia, H.K. Ting, S.J. Page, J.P. Clark, S. Li, T. Sang, L. Russo, M.M. Stevens, J. V. Hanna, J.R. Jones, Bioactive, Degradable and Tough Hybrids Through Calcium and Phosphate Incorporation, *Front Mater* 9 (2022) 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmats.2022.901196>.
- [37] J.R. Jones, Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomater* 9 (2013) 4457–4486. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.023>.
- [38] F.M. Al-Oqla, M.T. Hayajneh, M.M. Al-Shrida, Hybrid bio-fiber/bio-ceramic composite materials: Mechanical performance, thermal stability, and morphological analysis, *Reviews on Advanced Materials Science* 62 (2023). <https://doi.org/10.1515/rams-2023-0101>.
- [39] K. Zheng, M. Chai, B. Luo, K. Cheng, Z. Wang, N. Li, X. Shi, Recent progress of 3D printed vascularized tissues and organs, *Smart Mater Med* 5 (2024) 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2024.01.001>.
- [40] D.W. Hutmacher, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives, *J Biomater Sci Polym Ed* 12 (2001) 107–124. <https://doi.org/10.1163/156856201744489>.
- [41] D. Varghese, M. Deshpande, T. Xu, P. Kesari, S. Ohri, T. Boland, Advances in tissue engineering: Cell printing, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 129 (2005) 470–472. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2004.06.050>.
- [42] Z. Maan, N.Z. Masri, S.M. Willerth, Smart Bioinks for the Printing of Human Tissue Models, *Biomolecules* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/biom12010141>.
- [43] M. Kremer, E. Lang, A. Berger, Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra(TM) artificial skin), *Br J Plast Surg* 53 (2000) 459–465. <https://doi.org/10.1054/bjps.2000.3368>.
- [44] W. Sun, B. Starly, A.C. Daly, J.A. Burdick, J. Groll, G. Skeldon, W. Shu, Y. Sakai, M. Shinohara, M. Nishikawa, J. Jang, D.W. Cho, M. Nie, S. Takeuchi, S. Ostrovidov, A. Khademhosseini, R.D. Kamm, V. Mironov, L. Moroni, I.T.

- Ozbolat, The bioprinting roadmap, *Biofabrication* 12 (2020). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/AB5158>.
- [45] X. Yu, S. Jiang, D. Li, S.G. Shen, X. Wang, K. Lin, Osteoimmunomodulatory bioinks for 3D bioprinting achieve complete regeneration of critical-sized bone defects, *Compos B Eng* 273 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2024.111256>.
- [46] L. Keller, Y. Idoux-Gillet, Q. Wagner, S. Eap, D. Brasse, P. Schwinté, M. Arruebo, N. Benkirane-Jessel, Nanoengineered implant as a new platform for regenerative nanomedicine using 3D well-organized human cell spheroids, *Int J Nanomedicine* 12 (2017) 447–457. <https://doi.org/10.2147/IJN.S116749>.
- [47] B. Baroli, From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges, *J Pharm Sci* 98 (2009) 1317–1375. <https://doi.org/10.1002/jps.21528>.
- [48] D. Yang, J. Xiao, B. Wang, L. Li, X. Kong, J. Liao, The immune reaction and degradation fate of scaffold in cartilage/bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering C* 104 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109927>.
- [49] A.B. Rs, Tissue Response: Compromised Osseous tissue Biomaterials Dental implants Tissue response Osseous lesions, *Dental Clinics of NA* 59 (2015) 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2014.10.010>.
- [50] L.C.U. Junqueira, J. Carneiro, *Histologia básica texto, atlas*, Guanabara-Koogan, 2008.
- [51] M.D. Shoulders, R.T. Raines, Collagen structure and stability, *Annu Rev Biochem* 78 (2009) 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>.
- [52] J.F.P. Gomes, C.C. Granadeiro, M.A. Silva, M. Hoyos, R.D. Silva, T. Vieira, Síntese de HAP OPTIMIZAÇÃO DA REACÇÃO DE SÍNTESE DE HIDROXIAPATITE POR PRECIPITAÇÃO AQUOSA, 2007.
- [53] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater* 9 (2013) 7591–7621. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.
- [54] X. Wang, S. Xu, S. Zhou, W. Xu, M. Leary, P. Choong, M. Qian, M. Brandt, Y.M. Xie, Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review, *Biomaterials* 83 (2016) 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.012>.

- [55] T.C.Y. Harmony, N. Yusof, S. Ramalingam, R. Baharin, A. Syahrom, A. Mansor, Deep-Freezing Temperatures During Irradiation Preserves the Compressive Strength of Human Cortical Bone Allografts: A Cadaver Study, *Clin Orthop Relat Res* 480 (2022) 407–418. <https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000001968>.
- [56] C.E. Misch, Z. Qu, M.W. Bidez, *Mechanical Properties of Trabecular Bone in the Human Mandible: Implications for Dental Implant Treatment Planning and Surgical Placement*, 1999.
- [57] A. Reinisch, D. Thomas, M.R. Corces, X. Zhang, D. Gratzinger, W.J. Hong, K. Schallmoser, D. Strunk, R. Majeti, A humanized bone marrow ossicle xenotransplantation model enables improved engraftment of healthy and leukemic human hematopoietic cells, *Nat Med* 22 (2016) 812–821. <https://doi.org/10.1038/nm.4103>.
- [58] B.R. Barrioni, A.C. Oliveira, M. de Fátima Leite, M. de Magalhães Pereira, Sol-gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering, *J Mater Sci* 52 (2017) 8904–8927. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0944-6>.
- [59] I. Cacciotti, Bivalent cationic ions doped bioactive glasses: the influence of magnesium, zinc, strontium and copper on the physical and biological properties, *J Mater Sci* 52 (2017) 8812–8831. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1010-0>.
- [60] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee, Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, *J Biomed Mater Res* 5 (1971) 117–141. <https://doi.org/10.1002/jbm.820050611>.
- [61] M. Montazerian, E.D. Zanotto, A guided walk through Larry Hench’s monumental discoveries, *J Mater Sci* 52 (2017) 8695–8732. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0804-4>.
- [62] M. Cerruti, D. Greenspan, K. Powers, Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5, *Biomaterials* 26 (2005) 1665–1674. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.009>.
- [63] J.R. Jones, Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomater* 23 (2015) S53–S82. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.019>.
- [64] L.L. Hench, Bioceramics: From Concept to Clinic, *Journal of the American Ceramic Society* 74 (1991) 1487–1510. <https://doi.org/10.1111/J.1151-2916.1991.TB07132.X>.

- [65] M.N. Rahaman, D.E. Day, B. Sonny Bal, Q. Fu, S.B. Jung, L.F. Bonewald, A.P. Tomsia, Bioactive glass in tissue engineering, *Acta Biomater* 7 (2011) 2355–2373. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016>.
- [66] M. Barbeck, T. Serra, P. Booms, S. Stojanovic, S. Najman, E. Engel, R. Sader, C.J. Kirkpatrick, M. Navarro, S. Ghanaati, Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components – Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration, *Bioact Mater* 2 (2017) 208–223. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.06.001>.
- [67] F. Baino, M. Marshall, N. Kirk, C. Vitale-Brovarone, Design, selection and characterization of novel glasses and glass-ceramics for use in prosthetic applications, *Ceram Int* 42 (2016) 1482–1491. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.09.094>.
- [68] L. Ji, W. Qiao, K. Huang, Y. Zhang, H. Wu, S. Miao, H. Liu, Y. Dong, A. Zhu, D. Qiu, Synthesis of nanosized 58S bioactive glass particles by a three-dimensional ordered macroporous carbon template, *Materials Science and Engineering C* 75 (2017) 590–595. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.107>.
- [69] C.-L. Huang, W. Fang, I.-H. Chen, T.-Y. Hung, Manufacture and biomimetic mineral deposition of nanoscale bioactive glasses with mesoporous structures using sol-gel methods, *Ceram Int* 44 (2018) 17224–17229. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.06.180>.
- [70] A. Houaoui, A. Szczodra, M. Lallukka, L. El-Guermah, R. Agniel, E. Pauthe, J. Massera, M. Boissiere, New generation of hybrid materials based on gelatin and bioactive glass particles for bone tissue regeneration, *Biomolecules* 11 (2021) 1–16. <https://doi.org/10.3390/biom11030444>.
- [71] L.L. Hench, Bioceramics – from concept to clinic, *American Ceramic Society Bulletin* 74 (1991) 1487–1510.
- [72] A.B. Houreh, S. Labbaf, H.K. Ting, F. Ejeian, J.R. Jones, M.H.N. Esfahani, Influence of calcium and phosphorus release from bioactive glasses on viability and differentiation of dental pulp stem cells, *J Mater Sci* 52 (2017) 8928–8941. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0946-4>.
- [73] Q. Fu, E. Saiz, M.N. Rahaman, A.P. Tomsia, Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and future perspectives, *Materials Science and Engineering C* 31 (2011) 1245–1256. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.04.022>.

- [74] Q. Nawaz, A. de Pablos-Martín, J. Martins de Souza e Silva, L. Berthold, K. Hurle, A.T. Contreras Jaimes, M. Sitarz, D.S. Brauer, A.R. Boccaccini, Crystallization study of sol–gel derived 13-93 bioactive glass powder, *J Eur Ceram Soc* 41 (2021) 1695–1706. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2020.09.052>.
- [75] W.D. Kingery, H.K. Bowen, D.R. (Donald R. Uhlmann, Introduction to ceramics, Wiley, 1976.
- [76] D.M.M. dos Santos, S.M. de Carvalho, M.M. Pereira, M. Houmard, E.H.M. Nunes, Freeze-cast composite scaffolds prepared from sol-gel derived 58S bioactive glass and polycaprolactone, *Ceram Int* 45 (2019) 9891–9900. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.02.030>.
- [77] Q.Z. Chen, A. Efthymiou, V. Salih, A.R. Boccaccini, Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds: Study of cell proliferation and scaffold degradation in vitro, *J Biomed Mater Res A* 84 (2008) 1049–1060. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31512>.
- [78] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomaterials* 32 (2011) 2757–2774. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>.
- [79] W. Höland, Biocompatible and bioactive glass-ceramics - State of the art and new directions, *J Non Cryst Solids* 219 (1997) 192–197. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(97\)00329-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(97)00329-3).
- [80] O. Peitl, E. Dutra Zanotto, L.L. Hench, Highly bioactive P2O5–Na2O–CaO–SiO2 glass-ceramics, *J Non Cryst Solids* 292 (2001) 115–126. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(01\)00822-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(01)00822-5).
- [81] H. Teramoto, A. Kawai, S. Sugihara, A. Yoshida, H. Inoue, Resorption of Apatite-wollastonite containing glass-ceramic and beta-tricalcium phosphate in vivo, *Acta Med Okayama* 59 (2005) 201–207. <https://doi.org/10.18926/AMO/31974>.
- [82] B.R. Barrioni, A.C. Oliveira, M. de Fátima Leite, M. de Magalhães Pereira, Sol–gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering, *J Mater Sci* 52 (2017) 8904–8927. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0944-6>.
- [83] E. Gentleman, Y.C. Fredholm, G. Jell, N. Lotfibakhshaesh, M.D. O'Donnell, R.G. Hill, M.M. Stevens, The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro, *Biomaterials* 31 (2010) 3949–3956. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.121>.

- [84] O. Peitl, E. Dutra Zanotto, L.L. Hench, Highly bioactive P₂O₅–Na₂O–CaO–SiO₂ glass-ceramics, *J Non Cryst Solids* 292 (2001) 115–126. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(01\)00822-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(01)00822-5).
- [85] H. Teramoto, A. Kawai, S. Sugihara, A. Yoshida, H. Inoue, Resorption of Apatite-wollastonite containing glass-ceramic and beta-tricalcium phosphate in vivo, *Acta Med Okayama* 59 (2005) 201–207. <https://doi.org/10.18926/AMO/31974>.
- [86] E. Gentleman, Y.C. Fredholm, G. Jell, N. Lotfibakhshaiesh, M.D. O'Donnell, R.G. Hill, M.M. Stevens, The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro, *Biomaterials* 31 (2010) 3949–3956. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.121>.
- [87] C.G. Trejo, D. Lozano, M. Manzano, J.C. Doadrio, A.J. Salinas, S. Dapía, E. Gómez-Barrena, M. Vallet-Regí, N. García-Honduvilla, J. Buján, P. Esbrit, The osteoinductive properties of mesoporous silicate coated with osteostatin in a rabbit femur cavity defect model, *Biomaterials* 31 (2010) 8564–8573. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.103>.
- [88] A. Lucas-Girot, F.Z. Mezahi, M. Mami, H. Oudadesse, A. Harabi, M. Le Floch, Sol-gel synthesis of a new composition of bioactive glass in the quaternary system SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅: Comparison with melting method, *J Non Cryst Solids* 357 (2011) 3322–3327. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2011.06.002>.
- [89] R. Omid, P. Alizadeh, M. Soltani, Poly (amido amine) G5 modified mesoporous silica-based pH-responsive drug-delivery system for tetracycline and ibuprofen, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 72 (2022) 984–994. <https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2071270>.
- [90] F. Benedetti, L. Amidani, J.S. Pelli Cresi, F. Boscherini, S. Valeri, S. D'Addato, V. Nicolini, G. Malavasi, P. Luches, Role of cerium oxide in bioactive glasses during catalytic dissociation of hydrogen peroxide, *Physical Chemistry Chemical Physics* 20 (2018) 23507–23514. <https://doi.org/10.1039/c8cp02271b>.
- [91] B. Zheng, X. Lin, X. Zhang, D. Wu, K. Matyjaszewski, Emerging functional porous polymeric and carbonaceous materials for environmental treatment and energy storage, *Adv Funct Mater* 30 (2020) 1907006. <https://doi.org/10.1002/adfm.201907006>.
- [92] L.L. Hench, *Biomaterials: a forecast for the future*, 1998.

- [93] C.J. Brinker, G.W. Scherer, Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing, Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing (2013) 1–908. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-22386-5>.
- [94] C. Jeffrey. Brinker, G.W. Scherer, Sol-gel science : the physics and chemistry of sol-gel processing, Academic Press, 1990.
- [95] H. Nagai, M. Sato, Heat Treatment in Molecular Precursor Method for Fabricating Metal Oxide Thin Films, Heat Treatment - Conventional and Novel Applications (2012). <https://doi.org/10.5772/50676>.
- [96] C.J. Brinker, C.S. Ashley, R.A. Cairncross, K.S. Chen, A.J. Hurd, S.T. Reed, J. Samuel, P.R. Schunk, R.W. Schwartz, C.S. Scotto, Sol-gel derived ceramics films - Fundamentals and applications, in: K.H. Stern (Ed.), Metallurgical and Ceramics Protective Coatings, Amsterdam: Springer Netherlands, 1996: pp. 112–151.
- [97] P. Nyamukamba, O. Okoh, H. Mungondori, R. Taziwa, S. Zinya, Synthetic Methods for Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review, in: Titanium Dioxide - Material for a Sustainable Environment, InTech, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75425>.
- [98] V. Stanić, Variation in Properties of Bioactive Glasses After Surface Modification, Clinical Applications of Biomaterials: State-of-the-Art Progress, Trends, and Novel Approaches (2017) 35–63. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56059-5_2.
- [99] A.M. Deliormanli, Preparation, in vitro mineralization and osteoblast cell response of electrospun 13-93 bioactive glass nanofibers, Materials Science and Engineering C 53 (2015) 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.037>.
- [100] A.P.T. Mohamed N. Rahaman, Delbert E. Day, B. Sonny Bal, Qiang Fu, Steven B. Jung, Lynda F. Bonewald, Bioactive glass in tissue engineering, J Mater Sci Mater Med 24 (2013) 669–676. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016>. Bioactive.
- [101] C.E.C. Lins, A.A.R. Oliveira, I. Gonzalez, W.A.A. Macedo, M.M. Pereira, Structural analysis of fluorine-containing bioactive glass nanoparticles synthesized by sol–gel route assisted by ultrasound energy, J Biomed Mater Res B Appl Biomater 106 (2018) 360–366. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33846>.
- [102] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro, J Biomed Mater Res 28 (1994) 693–698. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280606>.

- [103] X. Liu, M.N. Rahaman, Q. Fu, A.P. Tomsia, Porous and strong bioactive glass (13-93) scaffolds prepared by unidirectional freezing of camphene-based suspensions, *Acta Biomater* 8 (2012) 415–423. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.07.034>.
- [104] T.S. Huang, M.N. Rahaman, N.D. Doiphode, M.C. Leu, B.S. Bal, D.E. Day, X. Liu, Freeze extrusion fabrication of 13-93 bioactive glass scaffolds for repair and regeneration of load-bearing bones, *Ceramic Transactions* 228 (2011) 45–55. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4236-4>.
- [105] J. Lao, Y. Wittrant, C. Bossard, H. Tiainen, C. Vial, H. Granel, É. Jallot, Polycaprolactone / bioactive glass hybrid scaffolds for bone regeneration, *Biomedical Glasses* 4 (2018) 108–122. <https://doi.org/10.1515/bglass-2018-0010>.
- [106] E.M. Bueno, J. Glowacki, Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration, *Nat Rev Rheumatol* 5 (2009) 685–697. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.228>.
- [107] I. Izquierdo-Barba, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, Bioactive Glasses: From Macro to Nano, *Int J Appl Glass Sci* 4 (2013) 149–161. <https://doi.org/10.1111/ijag.12028>.
- [108] M. de M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro., *J Biomed Mater Res* 28 (1994) 693–698.
- [109] A.N. Cormack, A. Tilocca, Structure and biological activity of glasses and ceramics, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 370 (2012) 1271–1280. <https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0371>.
- [110] S. Fujibayashi, M. Neo, H.-M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura, A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on Na₂O-CaO-SiO₂ glasses, 2003.
- [111] H. Zhu, C. Hu, F. Zhang, X. Feng, J. Li, T. Liu, J. Chen, J. Zhang, Preparation and antibacterial property of silver-containing mesoporous 58S bioactive glass, *Materials Science and Engineering C* 42 (2014) 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.004>.
- [112] P. Sepulveda, J.R. Jones, L.L. Hench, Characterization of Melt-Derived 45S5 and sol-gel-derived 58S Bioactive Glasses, (2001). <https://doi.org/10.1002/jbm.0000>.
- [113] J.H. Lopes, O.M.V.M. Bueno, I.O. Mazali, C.A. Bertran, Investigation of citric acid-assisted sol-gel synthesis coupled to the self-propagating combustion method for preparing bioactive glass with high structural homogeneity, *Materials Science*

- and Engineering: C 97 (2019) 669–678.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.022>.
- [114] N. Ghaebi Panah, R. Atkin, T.B. Sercombe, Effect of low temperature crystallization on 58S bioactive glass sintering and compressive strength, *Ceram Int* 47 (2021) 30349–30357. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.07.215>.
- [115] A.M. Deliormanlı, M. Yıldırım, Sol-gel synthesis of 13-93 bioactive glass powders containing therapeutic agents, *Journal of the Australian Ceramic Society* 52 (2016) 9–19.
- [116] Q. Nawaz, A. de Pablos-Martín, J. Martins de Souza e Silva, L. Berthold, K. Hurle, A.T. Contreras Jaimes, M. Sitarz, D.S. Brauer, A.R. Boccaccini, Crystallization study of sol-gel derived 13-93 bioactive glass powder, *J Eur Ceram Soc* 41 (2021) 1695–1706. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2020.09.052>.
- [117] E. Fiume, C. Migneco, E. Verné, F. Baino, Comparison between bioactive sol-gel and melt-derived glasses/glass-ceramics based on the multicomponent SiO₂-P₂O₅-CaO-MgO-Na₂O-K₂O system, *Materials* 13 (2020) 540. <https://doi.org/10.3390/ma13030540>.
- [118] F.B. Fantecelle, D.M.M. dos Santos, B.R. Barrioni, M.M. Pereira, H.A. Alcamand, M.L. Lapér, M. Houmard, E.H.M. Nunes, Structural, mechanical, and in vitro characterization of freeze-cast scaffolds prepared using a sol-gel-derived bioactive glass from the SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅-K₂O-MgO system, *Ceram Int* 49 (2023) 2183–2193. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.09.185>.
- [119] F.E. Ranjbar, F. Foroutan, M. Hajian, J. Ai, A. Farsinejad, S. Ebrahimi-Barough, M.M. Dehghan, M. Azami, Preparation and characterization of 58S bioactive glass based scaffold with Kaempferol-containing Zein coating for bone tissue engineering, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 109 (2021) 1259–1270. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34786>.
- [120] X. Liu, M.N. Rahaman, Q. Fu, Oriented bioactive glass (13-93) scaffolds with controllable pore size by unidirectional freezing of camphene-based suspensions: Microstructure and mechanical response, *Acta Biomater* 7 (2011) 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.025>.
- [121] K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 3413–3431. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>.

- [122] B.D. Ulery, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biomedical applications of biodegradable polymers, *J Polym Sci B Polym Phys* 49 (2011) 832–864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>.
- [123] Y. El-Ghoul, F.M. Alminderej, F.M. Alsubaie, R. Alrasheed, N.H. Almousa, Recent advances in functional polymer materials for energy, water, and biomedical applications: A review, *Polymers (Basel)* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13244327>.
- [124] R. Ramalingam, C. Dhand, C.M. Leung, S.T. Ong, S.K. Annamalai, M. Kamruddin, N.K. Verma, S. Ramakrishna, R. Lakshminarayanan, K.D. Arunachalam, Antimicrobial properties and biocompatibility of electrospun poly- ϵ -caprolactone fibrous mats containing *Gymnema sylvestre* leaf extract, *Materials Science and Engineering C* 98 (2019) 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.135>.
- [125] H.Y. Kweon, M.K. Yoo, I.K. Park, T.H. Kim, H.C. Lee, H.S. Lee, J.S. Oh, T. Akaike, C.S. Cho, A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering, *Biomaterials* 24 (2003) 801–808. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00370-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00370-8).
- [126] K.A. Athanasiou, C.M. Agrawal, F.A. Barber, S.S. Burkhart, Current Concepts Orthopaedic Applications for PLA-PGA Biodegradable Polymers, n.d.
- [127] C.C. Thong, D.C.L. Teo, C.K. Ng, Application of polyvinyl alcohol (PVA) in cement-based composite materials: A review of its engineering properties and microstructure behavior, *Constr Build Mater* 107 (2016) 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2015.12.188>.
- [128] R. Geyer, J.R. Jambeck, K.L. Law, Production, use, and fate of all plastics ever made, *Sci Adv* 3 (2017) 25–29. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- [129] H. Toutanji, B. Xu, J. Gilbert, T. Lavin, Properties of poly(vinyl alcohol) fiber reinforced high-performance organic aggregate cementitious material: Converting brittle to plastic, *Constr Build Mater* 24 (2010) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2009.08.023>.
- [130] D.R.S. C.C. DeMerlis*, Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA), *Adm Soc Work* 21 (1997) 31–65. https://doi.org/10.1300/j147v21n03_03.
- [131] R.O. Ebewele, Polymer science and technology, *Polymer Science and Technology* (2000) 1–531.

- [132] Estudo da polimerização do acetato de vinila utilizando a radiação ionizante. (Livro, 2002) [WorldCat.org], (n.d.). <https://www.worldcat.org/title/estudo-da-polimerizacao-do-acetato-de-vinila-utilizando-a-radiacao-ionizante/oclc/55921128> (accessed July 16, 2021).
- [133] Estudo da polimerização do acetato de vinila utilizando a radiação ionizante. (Livro, 2002) [WorldCat.org], (n.d.). <https://www.worldcat.org/title/estudo-da-polimerizacao-do-acetato-de-vinila-utilizando-a-radiacao-ionizante/oclc/55921128> (accessed July 15, 2021).
- [134] M.L. Hallensleben, R. Fuss, F. Mummy, Polyvinyl Compounds, Others, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (2015) 1–23. https://doi.org/10.1002/14356007.A21_743.PUB2.
- [135] T. Kuramoto, Evaluation of permeability and mechanical properties of composite polyvinyl alcohol films, Chemical Pharmaceutical Bulletin 17 (1994) 1460–1462.
- [136] S.S. Mulay, G. Becker, R. Vayrette, J.P. Raskin, T. Pardoen, M. Galceran, S. Godet, L. Noels, Multiscale modelling framework for the fracture of thin brittle polycrystalline films: Application to polysilicon, Comput Mech 55 (2015) 73–91. <https://doi.org/10.1007/s00466-014-1083-4>.
- [137] G. Becker, Numerical simulations of brittle and elasto-plastic fracture for thin structures subjected to dynamic loadings, Universite de Liege (2012) 252. <https://doi.org/http://hdl.handle.net/2268/113142> {DOI}.
- [138] S.S. Mulay, G. Becker, R. Vayrette, J.P. Raskin, T. Pardoen, M. Galceran, S. Godet, L. Noels, Multiscale modelling framework for the fracture of thin brittle polycrystalline films: Application to polysilicon, Comput Mech 55 (2015) 73–91. <https://doi.org/10.1007/s00466-014-1083-4>.
- [139] G. Becker, Numerical simulations of brittle and elasto-plastic fracture for thin structures subjected to dynamic loadings, Universite de Liege (2012) 252. <https://doi.org/http://hdl.handle.net/2268/113142> {DOI}.
- [140] Y. Zhang, P.Y. Ben Jar, S. Xue, L. Li, Quantification of strain-induced damage in semi-crystalline polymers: a review, J Mater Sci 54 (2019) 62–82. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2859-2>.
- [141] X. Xu, J. Zhao, M. Wang, L. Wang, J. Yang, 3D Printed Polyvinyl Alcohol Tablets with Multiple Release Profiles, Sci Rep 9 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48921-8>.

- [142] S. Boulila, H. Oudadesse, H. Elfeki, R. Kallel, B. Lefeuvre, M. Mabrouk, S. Tounsi, D. Mhalla, A. Mostafa, K. Chaabouni, F. Makni-Ayedi, A. Barroug, T. Boudawara, A. Elfeki, Antibacterial and in vivo reactivity of bioactive glass and poly(vinyl alcohol) composites prepared by melting and sol-gel techniques, *Korean Journal of Chemical Engineering* 33 (2016) 1659–1668. <https://doi.org/10.1007/s11814-015-0298-1>.
- [143] M. Mahmoudi, P. Alizadeh, M. Soltani, Wound healing performance of electrospun PVA/70S30C bioactive glass/Ag nanoparticles mats decorated with curcumin: In vitro and in vivo investigations, *Biomaterials Advances* 153 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213530>.
- [144] E. Vafa, R. Bazargan-lari, M.E. Bahrololoom, A.M. Amani, Effect of polyvinyl alcohol concentration on biomedical application of chitosan/bioactive glass composite coated on AZ91D magnesium alloy, *Mater Chem Phys* 291 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.126650>.
- [145] A. Abd El-Fattah, M. Nageeb Hassan, A. Rashad, M. Marei, S. Kandil, Viscoelasticity, mechanical properties, and in vivo biocompatibility of injectable polyvinyl alcohol/bioactive glass composite hydrogels as potential bone tissue scaffolds, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* (2020) 362–373. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2020.1790253>.
- [146] J.D. Souza, *Elaboração de material didático-instrucional de processos de fabricação de material compósito de matriz polimérica utilizado na indústria aeronáutica*, 2018.
- [147] S.J. Hong, H.S. Yu, H.W. Kim, Tissue engineering polymeric microcarriers with macroporous morphology and bone-bioactive surface, *Macromol Biosci* 9 (2009) 639–645. <https://doi.org/10.1002/mabi.200800304>.
- [148] S. Wu, X. Liu, K.W.K. Yeung, C. Liu, X. Yang, Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering R: Reports* 80 (2014) 1–36. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.04.001>.
- [149] C.J. Brinker, G.W. Scherrer, Sol-gel Processing, in: *Sol Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, New York, 1990: pp. 2–11.
- [150] Xia Li, J. Shi, X. Dong, L. Zhang, H. Zeng, A mesoporous bioactive glass/polycaprolactone composite scaffold and its bioactivity behavior, *J Biomed Mater Res* 84A (2008) 84–91. <https://doi.org/10.1002/jbm.a>.

- [151] C. Sanchez, B. Julián, P. Belleville, M. Popall, Applications of hybrid organic-inorganic nanocomposites, *J Mater Chem* 15 (2005) 3559–3592. <https://doi.org/10.1039/b509097k>.
- [152] S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay, Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends Biotechnol* 30 (2012) 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>.
- [153] G. Kickelbick, Hybrid Materials – Past, Present and Future., *Hybrid Materials* 1 (2014). <https://doi.org/10.2478/hyma-2014-0001>.
- [154] A. Mehdi, C. Reye, R. Corriu, From molecular chemistry to hybrid nanomaterials. Design and functionalization, *Chem Soc Rev* 40 (2011) 563–574. <https://doi.org/10.1039/b920516k>.
- [155] M.M. Pereira, J.R. Jones, L.L. Hench, Bioactive glass and hybrid scaffolds prepared by sol–gel method for bone tissue engineering, *Advances in Applied Ceramics* 104 (2005) 35–42. <https://doi.org/10.1179/174367605225011034>.
- [156] B.A. Allo, D.O. Costa, S.J. Dixon, K. Mequanint, A.S. Rizkalla, Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration, *J Funct Biomater* 3 (2012) 432–463. <https://doi.org/10.3390/jfb3020432>.
- [157] W. Park, H. Shin, B. Choi, W.K. Rhim, K. Na, D. Keun Han, Advanced hybrid nanomaterials for biomedical applications, *Prog Mater Sci* 114 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100686>.
- [158] H.S. Mansur, H.S. Costa, Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly(vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications, *Chemical Engineering Journal* 137 (2008) 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.09.036>.
- [159] F. Tallia, L. Russo, S. Li, A.L.H. Orrin, X. Shi, S. Chen, J.A.M. Steele, S. Meille, J. Chevalier, P.D. Lee, M.M. Stevens, L. Cipolla, J.R. Jones, Bouncing and 3D printable hybrids with self-healing properties, *Mater Horiz* 5 (2018) 849–860. <https://doi.org/10.1039/c8mh00027a>.
- [160] L.L. Hench, J.R. Jones, Bioactive glasses: Frontiers and Challenges, *Front Bioeng Biotechnol* 3 (2015). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00194>.
- [161] P.R. Buenzli, M. Lanaro, C.S. Wong, M.P. McLaughlin, M.C. Allenby, M.A. Woodruff, M.J. Simpson, Cell proliferation and migration explain pore bridging dynamics in 3D printed scaffolds of different pore size, *Acta Biomater* 114 (2020) 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.010>.

- [162] I. Bružauskaitė, D. Bironaitė, E. Bagdonas, E. Bernotienė, Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects, *Cytotechnology* 68 (2016) 355–369. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9895-4>.
- [163] L. Wang, C. Wang, L. Zhou, Z. Bi, M. Shi, D. Wang, Q. Li, Fabrication of a novel Three-Dimensional porous PCL/PLA tissue engineering scaffold with high connectivity for endothelial cell migration, *Eur Polym J* 161 (2021) 110834. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110834>.
- [164] G. Shao, D.A.H. Hanaor, X. Shen, A. Gurlo, *Freeze-casting*: From low-dimensional building blocks to aligned porous structures - A review of novel materials, methods, and applications, *Advanced Materials* 32 (2020) 1907176. <https://doi.org/10.1002/adma.201907176>.
- [165] U.G.K. Wegst, P.H. Kamm, K. Yin, F. García-Moreno, *Freeze-casting*, *Nature Reviews Methods Primers* 4 (2024) 28. <https://doi.org/10.1038/s43586-024-00307-5>.
- [166] S. Deville, *Freeze-casting* of porous ceramics: A review of current achievements and issues, *Adv Eng Mater* 10 (2008) 155–169. <https://doi.org/10.1002/adem.200700270>.
- [167] G.T. Araújo, T.S. Brito, D.F. Souza, A.M.A. Silva, E.H.M. Nunes, M. Houmard, Preparation of Al₂O₃ and MgAl₂O₄-based samples with tailored macroporous structures, *Ceram Int* 44 (2017) 580–587. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.09.216>.
- [168] S. Deville, E. Saiz, A.P. Tomsia, *Freeze-casting* of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 5480–5489. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.028>.
- [169] S. Deville, *Freeze-casting* of porous ceramics: A review of current achievements and issues, *Adv Eng Mater* 10 (2008) 155–169. <https://doi.org/10.1002/adem.200700270>.
- [170] D. Santos, Síntese e caracterização de scaffolds do compósito vidro bioativo/policaprolactona obtidos por processo *freeze-casting*, Belo Horizonte, 2019.
- [171] T. Fukasawa, M. Ando, T. Ohji, S. Kanzaki, Synthesis of Porous Ceramics with Complex Pore Structure by Freeze-Dry Processing, *Journal of the American Ceramic Society* 84 (2001) 230–232. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2001.tb00638.x>.

- [172] J.W. Moon, H.J. Hwang, M. Awano, K. Maeda, Preparation of NiO-YSZ tubular support with radially aligned pore channels, *Mater Lett* 57 (2003) 1428–1434. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(02\)01002-9](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(02)01002-9).
- [173] J. Han, C. Hong, X. Zhang, J. Du, W. Zhang, Highly porous ZrO₂ ceramics fabricated by a camphene-based *freeze-casting* route: Microstructure and properties, *J Eur Ceram Soc* 30 (2010) 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2009.08.018>.
- [174] M. Mozafari, F. Moztarzadeh, Synthesis, characterization and biocompatibility evaluation of sol-gel derived bioactive glass scaffolds prepared by *freeze-casting* method, *Ceram Int* 40 (2014) 5349–5355. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.10.115>.
- [175] S. Deville, *Freeze-casting* of porous ceramics: A review of current achievements and issues, in: *Adv Eng Mater*, 2008: pp. 155–169. <https://doi.org/10.1002/adem.200700270>.
- [176] S. Deville, *Freeze-casting* of porous biomaterials: Structure, properties and opportunities, *Materials* 3 (2010) 1913–1927. <https://doi.org/10.3390/ma3031913>.
- [177] L.N.R.M. Santos, J.R.S. Silva, J.M. Cartaxo, A.M. Rodrigues, G.A. Neves, R.R. Menezes, *Freeze-casting* applied to ceramic materials: A short review of the influence of processing parameters, *Ceramica* 67 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.1590/0366-69132021673812923>.
- [178] P. Lagarrigue, V. Darcos, C. Tenailleau, B. Duployer, A. Dupret-Bories, S. Cazalbou, D. Poquillon, D. Grossin, C. Combes, J. Soulié, Poly(D,L-lactide)-Grafted Bioactive Glass Nanoparticles: From Nanobricks to Freeze-Cast Scaffolds for Bone Substitution, *ACS Appl Nano Mater* 5 (2022) 5278–5291. <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c00313>.
- [179] F. Zou, H. Li, Y. Dong, G.C. Tewari, J. Vapaavuori, Optically transparent pectin/poly(methyl methacrylate) composite with thermal insulation and UV blocking properties based on anisotropic pectin cryogel, *Chemical Engineering Journal* 439 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135738>.
- [180] X. Zhao, A.H. Brozena, L. Hu, Critical roles of pores and moisture in sustainable nanocellulose-based super-thermal insulators, *Matter* 4 (2021) 769–772. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2021.02.002>.

- [181] W.L. Li, K. Lu, J.Y. Walz, *Freeze-casting* of porous materials: review of critical factors in microstructure evolution, *International Materials Reviews* 57 (2012) 37–60. <https://doi.org/10.1179/1743280411Y.0000000011>.
- [182] I. Gibson, The changing face of additive manufacturing, *Journal of Manufacturing Technology Management* 28 (2017) 10–17. <https://doi.org/10.1108/JMTM-12-2016-0182>.
- [183] W. Sun, B. Starly, A.C. Daly, J.A. Burdick, J. Groll, G. Skeldon, W. Shu, Y. Sakai, M. Shinohara, M. Nishikawa, J. Jang, D.W. Cho, M. Nie, S. Takeuchi, S. Ostrovidov, A. Khademhosseini, R.D. Kamm, V. Mironov, L. Moroni, I.T. Ozbolat, The bioprinting roadmap, *Biofabrication* 12 (2020). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/AB5158>.
- [184] D. Mondal, E. Diederichs, T.L. Willett, Enhanced Mechanical Properties of 3D Printed Nanocomposites Composed of Functionalized Plant-Derived Biopolymers and Calcium-Deficient Hydroxyapatite Nanoparticles, *Front Mater* 9 (2022). <https://doi.org/10.3389/fmats.2022.833065>.
- [185] K. Gupta, K. Meena, Artificial bone scaffolds and bone joints by additive manufacturing: A review, *Bioprinting* 31 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00268>.
- [186] Y. Cao, B. Yang, C. Gao, P. Feng, C. Shuai, Laser sintering of nano 13-93 glass scaffolds: Microstructure, mechanical properties and bioactivity, *Science of Sintering* 47 (2015) 31–39. <https://doi.org/10.2298/SOS1501031C>.
- [187] D. Dong, H. Su, X. Li, G. Fan, D. Zhao, Z. Shen, Y. Liu, Y. Guo, C. Yang, L. Liu, H. Fu, Microstructures and mechanical properties of biphasic calcium phosphate bioceramics fabricated by SLA 3D printing, *J Manuf Process* 81 (2022) 433–443. <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2022.07.016>.
- [188] H. Qu, Additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds, *Mater Today Commun* 24 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101024>.
- [189] Y. Zhang, Q. Zhang, F. He, F. Zuo, X. Shi, Fabrication of cancellous-bone-mimicking β -tricalcium phosphate bioceramic scaffolds with tunable architecture and mechanical strength by stereolithography 3D printing, *J Eur Ceram Soc* 42 (2022) 6713–6720. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2022.07.033>.
- [190] M.-A. Shahbazi, M. Ghalkhani, H. Maleki, Directional *freeze-casting*: A bioinspired method to assemble multifunctional aligned porous structures for

- advanced applications, *Adv Eng Mater* 22 (2020) 2000033. <https://doi.org/10.1002/adem.202000033>.
- [191] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro, *J Biomed Mater Res* 28 (1994) 693–698. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280606>.
- [192] J. Faure, R. Drevet, A. Lemelle, N. Ben Jaber, A. Tara, H. El Btaouri, H. Benhayoune, A new sol-gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst, *Materials Science and Engineering C* 47 (2015) 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.045>.
- [193] L.M. Henning, S. Zavareh, P.H. Kamm, M. Höner, H. Fischer, J. Banhart, F. Schmidt, A. Gurlo, Manufacturing and Characterization of Highly Porous Bioactive Glass Composite Scaffolds Using Unidirectional *Freeze-casting*, *Adv Eng Mater* 19 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1002/adem.201700129>.
- [194] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials* 27 (2006) 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- [195] P. Sepulveda, J.R. Jones, L.L. Hench, Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses, *J Biomed Mater Res* 58 (2001) 734–740. <https://doi.org/10.1002/jbm.10026>.
- [196] Q. Nawaz, M.A.U. Rehman, A. Burkovski, J. Schmidt, A.M. Beltrán, A. Shahid, N.K. Alber, W. Peukert, A.R. Boccaccini, Synthesis and characterization of manganese containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications, *J Mater Sci Mater Med* 29 (2018) 64. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6070-4>.
- [197] A. Balamurugan, G. Sockalingum, J. Michel, J. Fauré, V. Banchet, L. Wortham, S. Bouthors, D. Laurent-Maquin, G. Balossier, Synthesis and characterisation of sol gel derived bioactive glass for biomedical applications, *Mater Lett* 60 (2006) 3752–3757. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.03.102>.
- [198] J. Serra, P. González, S. Liste, C. Serra, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor, H.O. Ylänen, M. Hupa, FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses, *J Non Cryst Solids* 332 (2003) 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2003.09.013>.
- [199] G. Luo, Y. Ma, X. Cui, L. Jiang, M. Wu, Y. Hu, Y. Luo, H. Pan, C. Ruan, 13-93 bioactive glass/alginate composite scaffolds 3D printed under mild conditions for

- bone regeneration, RSC Adv 7 (2017) 11880–11889. <https://doi.org/10.1039/c6ra27669e>.
- [200] A.M. Deliormanli, Preparation, in vitro mineralization and osteoblast cell response of electrospun 13-93 bioactive glass nanofibers, Materials Science and Engineering C 53 (2015) 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.037>.
- [201] Q. Fu, M.N. Rahaman, B.S. Bal, W. Huang, D.E. Day, Preparation and bioactive characteristics of a porous 13-93 glass, and fabrication into the articulating surface of a proximal tibia, J Biomed Mater Res A 82A (2007) 222–229. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31156>.
- [202] H. Yoshino, K. Kamiya, H. Nasu, IR study on the structural evolution of sol-gel derived SiO₂ gels in the early stage of conversion to glasses, J Non Cryst Solids 126 (1990) 68–78. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(90\)91024-L](https://doi.org/10.1016/0022-3093(90)91024-L).
- [203] R.M. Almeida, C.G. Pantano, Structural investigation of silica gel films by infrared spectroscopy, J Appl Phys 68 (1990) 4225–4232. <https://doi.org/10.1063/1.346213>.
- [204] M. Raz, F. Moztarzadeh, S.S. Kordestani, Sol-gel based fabrication and properties of Mg-Zn doped bioactive glass/gelatin composite scaffold for bone tissue engineering, Silicon 10 (2018) 667–674. <https://doi.org/10.1007/s12633-016-9510-0>.
- [205] C.B. Carter, M.G. Norton, Complex crystal and glass structures, in: C.B. Carter, M.G. Norton (Eds.), Ceramic Materials: Science and Engineering, Springer New York, New York, NY, 2007: pp. 100–119. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46271-4_7.
- [206] A.J. Salinas, S. Shruti, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet-Regí, Substitutions of cerium, gallium and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses, Acta Biomater 7 (2011) 3452–3458. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.033>.
- [207] A.M. Deliormanli, Preparation, in vitro mineralization and osteoblast cell response of electrospun 13-93 bioactive glass nanofibers, Materials Science and Engineering C 53 (2015) 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.037>.
- [208] T. Waschkies, R. Oberacker, M.J. Hoffmann, Control of lamellae spacing during *freeze-casting* of ceramics using double-side cooling as a novel processing route, Journal of the American Ceramic Society 92 (2009) S79–S84. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2008.02673.x>.

- [209] K. Huang, S. Cai, G. Xu, M. Ren, X. Wang, R. Zhang, S. Niu, H. Zhao, Sol-gel derived mesoporous 58S bioactive glass coatings on AZ31 magnesium alloy and in vitro degradation behavior, *Surf Coat Technol* 240 (2014) 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2013.12.026>.
- [210] F.B. Fantecelle, D.M.M. dos Santos, B.R. Barrioni, M.M. Pereira, H.A. Alcamand, M.L. Lapér, M. Houmard, E.H.M. Nunes, Structural, mechanical, and in vitro characterization of freeze-cast scaffolds prepared using a sol-gel-derived bioactive glass from the SiO₂–CaO–Na₂O–P₂O₅–K₂O–MgO system, *Ceram Int* 49 (2023) 2183–2193. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.09.185>.
- [211] K. Huang, S. Cai, G. Xu, M. Ren, X. Wang, R. Zhang, S. Niu, H. Zhao, Sol-gel derived mesoporous 58S bioactive glass coatings on AZ31 magnesium alloy and in vitro degradation behavior, *Surf Coat Technol* 240 (2014) 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2013.12.026>.
- [212] D.M.M. dos Santos, S.M. de Carvalho, M.M. Pereira, M. Houmard, E.H.M. Nunes, Freeze-cast composite scaffolds prepared from sol-gel derived 58S bioactive glass and polycaprolactone, *Ceram Int* 45 (2019) 9891–9900. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.02.030>.
- [213] J. Li, X. Yuan, F. He, A.F.T. Mak, Hybrid coating of hydroxyapatite and collagen within poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) scaffold, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 86B (2008) 381–388. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31031>.
- [214] C. Öhman, M. Baleani, C. Pani, F. Taddei, M. Alberghini, M. Viceconti, M. Manfrini, Compressive behaviour of child and adult cortical bone, *Bone* 49 (2011) 769–776. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.06.035>.
- [215] L. Ji, W. Qiao, K. Huang, Y. Zhang, H. Wu, S. Miao, H. Liu, Y. Dong, A. Zhu, D. Qiu, Synthesis of nanosized 58S bioactive glass particles by a three-dimensional ordered macroporous carbon template, *Materials Science and Engineering C* 75 (2017) 590–595. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.107>.
- [216] H. Gheisari, E. Karamian, M. Abdollahi, A novel hydroxyapatite - Hardystonite nanocomposite ceramic, *Ceram Int* 41 (2015) 5967–5975. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.01.033>.
- [217] F.B. Fantecelle, D.M.M. dos Santos, B.R. Barrioni, M.M. Pereira, H.A. Alcamand, M.L. Lapér, M. Houmard, E.H.M. Nunes, Structural, mechanical, and in vitro characterization of freeze-cast scaffolds prepared using a sol-gel-derived bioactive

- glass from the SiO₂–CaO–Na₂O–P₂O₅–K₂O–MgO system, *Ceram Int* 49 (2023) 2183–2193. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.09.185>.
- [218] Q. Nawaz, A. de Pablos-Martín, A.T. Contreras Jaimes, F. Scheffler, T. Wagner, D.S. Brauer, A.R. Boccaccini, Comparison of microstructure, sintering behavior, and biological response of sol-gel and melt-derived 13–93 bioactive glass scaffolds, *Open Ceramics* 15 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2023.100407>.
- [219] H.S. Budi, M.C. Setyawati, S. Anitasari, Y.K. Shen, I. Pebriani, D.E. Ramadan, Cell detachment rates and confluence of fibroblast and osteoblast cell culture using different washing solutions, *Brazilian Journal of Biology* 84 (2024) 1–8. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.265825>.
- [220] D.A. Wahl, J.T. Czernuszka, Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair, *Eur Cell Mater* 11 (2006) 43–56. <https://doi.org/10.22203/eCM.v011a06>.
- [221] N. Rosa, M.F.S.F. Moura, S. Olhero, R. Simoes, F.D. Magalhães, A.T. Marques, J.P.S. Ferreira, A.R. Reis, M. Carvalho, M. Parente, Bone: An outstanding composite material, *Applied Sciences* 12 (2022) 3381. <https://doi.org/10.3390/app12073381>.
- [222] A. Shearer, M. Montazerian, J.J. Sly, R.G. Hill, J.C. Mauro, Trends and perspectives on the commercialization of bioactive glasses, *Acta Biomater* 160 (2023) 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.02.020>.
- [223] A. Moghanian, S. Firoozi, M. Tahriri, Characterization, in vitro bioactivity and biological studies of sol-gel synthesized SrO substituted 58S bioactive glass, *Ceram Int* 43 (2017) 14880–14890. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.08.004>.
- [224] A. Moghanian, M. Zohourfazeli, M.H.M. Tajer, The effect of zirconium content on in vitro bioactivity, biological behavior and antibacterial activity of sol-gel derived 58S bioactive glass, *J Non Cryst Solids* 546 (2020) 120262. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrsol.2020.120262>.
- [225] A. Kumar, S.S. Han, PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 66 (2017) 159–182. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1190930>.
- [226] K.G. Nathan, K. Genasan, T. Kamarul, Polyvinyl alcohol-Chitosan scaffold for tissue engineering and regenerative medicine application: A review, *Mar Drugs* 21 (2023) 304. <https://doi.org/10.3390/md21050304>.

- [227] D. Feldman, Poly(vinyl alcohol) recent contributions to engineering and medicine, *Journal of Composites Science* 4 (2020) 175. <https://doi.org/10.3390/jcs4040175>.
- [228] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro, *J Biomed Mater Res* 28 (1994) 693–698. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280606>.
- [229] Q. Nawaz, M.A.U. Rehman, A. Burkovski, J. Schmidt, A.M. Beltrán, A. Shahid, N.K. Alber, W. Peukert, A.R. Boccaccini, Synthesis and characterization of manganese containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications, *J Mater Sci Mater Med* 29 (2018) 667–674. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6070-4>.
- [230] Q.Z. Chen, A. Efthymiou, V. Salih, A.R. Boccaccini, Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds: Study of cell proliferation and scaffold degradation in vitro, *J Biomed Mater Res A* 84 (2008) 1049–1060. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31512>.
- [231] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomaterials* 32 (2011) 2757–2774. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>.
- [232] M. Raz, F. Moztarzadeh, S.S. Kordestani, Sol-gel based fabrication and properties of Mg-Zn doped bioactive glass/gelatin composite scaffold for bone tissue engineering, *Silicon* 10 (2018) 667–674. <https://doi.org/10.1007/s12633-016-9510-0>.
- [233] R.M. Almeida, C.G. Pantano, Structural investigation of silica gel films by infrared spectroscopy, *J Appl Phys* 68 (1990) 4225–4232. <https://doi.org/10.1063/1.346213>.
- [234] T.K. Ghosh, S.K. Chakrabarti, S. Ghosh, S. Saha, S. Dey, S.K. Das, Synthesis, characterization, bioactivity and cytotoxicity assessment of nano ZrO₂ reinforced bioactive glass ceramics, *Ceram Int* 49 (2023) 32694–32710. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.07.237>.
- [235] G.P. Delpino, R. Borges, T. Zambanini, J.F.S. Joca, I. Gaubeur, A.C.S. de Souza, J. Marchi, Sol-gel-derived 58S bioactive glass containing holmium aiming brachytherapy applications: A dissolution, bioactivity, and cytotoxicity study, *Materials Science and Engineering: C* 119 (2021) 111595. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111595>.
- [236] H. Hadem, A.K. Ojha, A. Mitra, R. Rajasekaran, P.V. Vaidya, S. Dhara, S. Das, K. Das, Mixed alkali effect on the mechanical, thermal and biological properties

- of 58S bioactive glass, *Ceram Int* (2024) In press.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2024.05.490>.
- [237] M. Ebrahimi, S. Manafi, F. Sharifianjazi, The effect of Ag₂O and MgO dopants on the bioactivity, biocompatibility, and antibacterial properties of 58S bioactive glass synthesized by the sol-gel method, *J Non Cryst Solids* 606 (2023) 122189. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2023.122189>.
- [238] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry* 87 (2015) 1051–1069. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>.
- [239] K. Zheng, A.R. Boccaccini, Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review, *Adv Colloid Interface Sci* 249 (2017) 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.03.008>.
- [240] K. Deshmukh, T. Kovářik, T. Křenek, D. Docheva, T. Stich, J. Pola, Recent advances and future perspectives of sol-gel derived porous bioactive glasses: a review, *RSC Adv* 10 (2020) 33782–33835. <https://doi.org/10.1039/d0ra04287k>.
- [241] Q. Nawaz, A. de Pablos-Martín, J. Martins de Souza e Silva, L. Berthold, K. Hurle, A.T. Contreras Jaimes, M. Sitarz, D.S. Brauer, A.R. Boccaccini, Crystallization study of sol-gel derived 13-93 bioactive glass powder, *J Eur Ceram Soc* 41 (2021) 1695–1706. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2020.09.052>.
- [242] N. Soltani, U. Simon, A. Bahrami, X. Wang, S. Selve, J.D. Epping, M.I. Pech-Canul, M.F. Bekheet, A. Gurlo, Macroporous polymer-derived SiO₂/SiOC monoliths freeze-cast from polysiloxane and amorphous silica derived from rice husk, *J Eur Ceram Soc* 37 (2017) 4809–4820. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2017.06.023>.
- [243] A.M.A. Silva, E.H.M. Nunes, D.F. Souza, D.L. Martens, J.C. Diniz da Costa, M. Houmard, W.L. Vasconcelos, Effect of titania addition on the properties of freeze-cast alumina samples, *Ceram Int* 41 (2015) 10467–10475. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.04.132>.
- [244] K.L. Scotti, D.C. Dunand, *Freeze-casting* – A review of processing, microstructure and properties via the open data repository, *FreezeCasting.net*, *Prog Mater Sci* 94 (2018) 243–305. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.01.001>.

- [245] S. Deville, *Freeze-casting* of porous biomaterials: Structure, properties and opportunities, *Materials* 3 (2010) 1913–1927. <https://doi.org/10.3390/ma3031913>.
- [246] H.K. Chang, C.W. Huang, C.C. Chiu, H.J. Wang, P.Y. Chen, Fabrication of anisotropic poly(vinyl alcohol) scaffolds with controllable mechanical properties and structural recoverability under compression via a *freeze-casting* technique, *Macromolecules* 53 (2020) 8809–8818. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c01608>.
- [247] D.M.M. dos Santos, S.M. de Carvalho, M.M. Pereira, M. Houmard, E.H.M. Nunes, Freeze-cast composite scaffolds prepared from sol-gel derived 58S bioactive glass and polycaprolactone, *Ceram Int* 45 (2019) 9891–9900. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.02.030>.
- [248] F.J. Martínez-Vázquez, F.H. Perera, P. Miranda, A. Pajares, F. Guiberteau, Improving the compressive strength of bioceramic robocast scaffolds by polymer infiltration, *Acta Biomater* 6 (2010) 4361–4368. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.05.024>.
- [249] S. Ramesh, C.Y. Tan, M. Hamdi, I. Sopyan, W.D. Teng, The influence of Ca/P ratio on the properties of hydroxyapatite bioceramics, in: *International Conference on Smart Materials and Nanotechnology in Engineering*, SPIE, 2007: p. 64233A. <https://doi.org/10.1117/12.779890>.
- [250] Xia Li, J. Shi, X. Dong, L. Zhang, H. Zeng, A mesoporous bioactive glass/polycaprolactone composite scaffold and its bioactivity behavior, *J Biomed Mater Res* 84A (2008) 84–91. <https://doi.org/10.1002/jbm.a>.
- [251] E. Tamjid, R. Bagheri, M. Vossoughi, A. Simchi, Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites, *Materials Science and Engineering C* 31 (2011) 1526–1533. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.06.013>.
- [252] Y. Ma, Y. Zheng, X. Huang, T. Xi, X. Lin, D. Han, W. Song, Mineralization behavior and interface properties of BG-PVA/bone composite implants in simulated body fluid, *Biomedical Materials* 5 (2010). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/5/2/025003>.
- [253] V.S. Gomide, A. Zonari, N.M. Ocarino, A.M. Goes, R. Serakides, M.M. Pereira, In vitro and in vivo osteogenic potential of bioactive glass - PVA hybrid scaffolds colonized by mesenchymal stem cells, *Biomedical Materials* 7 (2012). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/1/015004>.

- [254] L. Pang, Y. Shen, H. Hu, X. Zeng, W. Huang, H. Gao, H. Wang, D. Wang, Chemically and physically cross-linked polyvinyl alcohol-borosilicate gel hybrid scaffolds for bone regeneration, *Materials Science and Engineering C* 105 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110076>.
- [255] Y.J. Shin, D.H. Yang, M.H. Oh, Y.S. Yoon, J.S. Shin, Hard coatings on polycarbonate plate by sol-gel reactions of melamine derivative, poly(vinyl alcohol), and silicates, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 15 (2009) 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2008.09.009>.
- [256] M.M. Pereira, J.R. Jones, R.L. Orefice, L.L. Hench, Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method, *J Mater Sci Mater Med* 16 (2005) 1045–1050. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-4758-8>.
- [257] S.A. Pirzada, Tahira; Arvidson, Sara A.; Saquing, Carl D.; Sakhawat Shah, S.; Khan, Hybrid Silica–PVA Nanofibers via Sol–Gel Electrospinning.pdf, (2012) 5834–5844.
- [258] B. Yu, C.A. Turdean-Ionescu, R.A. Martin, R.J. Newport, J. V. Hanna, M.E. Smith, J.R. Jones, Effect of calcium source on structure and properties of sol-gel derived bioactive glasses, *Langmuir* 28 (2012) 17465–17476. <https://doi.org/10.1021/la303768b>.
- [259] T. Franca, D. Goncalves, C. Cena, ATR-FTIR spectroscopy combined with machine learning for classification of PVA/PVP blends in low concentration, *Vib Spectrosc* 120 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2022.103378>.
- [260] T. Pirzada, S.A. Arvidson, C.D. Saquing, S.S. Shah, S.A. Khan, Hybrid silica-PVA nanofibers via sol-gel electrospinning, *Langmuir* 28 (2012) 5834–5844. <https://doi.org/10.1021/la300049j>.
- [261] C. Paluszkiwicz, A. Ślósarczyk, D. Pijocha, M. Sitarz, M. Bućko, A. Zima, A. Chróścicka, M. Lewandowska-Szumieł, Synthesis, structural properties and thermal stability of Mn-doped hydroxyapatite, *J Mol Struct* 976 (2010) 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.04.001>.
- [262] C.D.F. Moreira, S.M. Carvalho, H.S. Mansur, M.M. Pereira, Thermogelling chitosan-collagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering, *Materials Science and Engineering C* 58 (2016) 1207–1216. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.075>.

- [263] T. Pirzada, S.S. Shah, Water-Resistant Poly(vinyl alcohol)-Silica Hybrids through Sol-Gel Processing, *Chem Eng Technol* 37 (2014) 620–626. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300295>.
- [264] B. Babiarczuk, D. Lewandowski, A. Szczurek, K. Kierzek, M. Meffert, D. Gerthsen, J. Kaleta, J. Krzak, Novel approach of silica-PVA hybrid aerogel synthesis by simultaneous sol-gel process and phase separation, *Journal of Supercritical Fluids* 166 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104997>.
- [265] D.I. Tee, M. Mariatti, A. Azizan, C.H. See, K.F. Chong, Effect of silane-based coupling agent on the properties of silver nanoparticles filled epoxy composites, *Compos Sci Technol* 67 (2007) 2584–2591. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2006.12.007>.
- [266] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro, *J Biomed Mater Res* 28 (1994) 693–698. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280606>.
- [267] A.S. Cruz, C.A. Figueiredo, C.H.O. Martinez, L.F. Gomes, Detecção da citotoxicidade de materiais biocompatíveis nas linhagens celulares MRC-5, HeLa e RC-IAL, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* (1992).
- [268] H. Elkhoully, W. Mamdouh, D.I. El-Korashy, Electrospun nano-fibrous bilayer scaffold prepared from polycaprolactone/gelatin and bioactive glass for bone tissue engineering, *J Mater Sci Mater Med* 32 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06588-6>.
- [269] M.O. Prado, M. Biesuz, M. Frasnelli, F.E. Benedetto, V.M. Sglavo, Viscous flow flash sintering of porous silica glass, *J Non Cryst Solids* 476 (2017) 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2017.09.024>.
- [270] S. Meille, M. Lombardi, J. Chevalier, L. Montanaro, Mechanical properties of porous ceramics in compression: On the transition between elastic, brittle, and cellular behavior, *J Eur Ceram Soc* 32 (2012) 3959–3967. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2012.05.006>.
- [271] J.H.C. Calegari, T.C.C. Marqueze, O.S.T. El Kadri, E.J.G. Pereira, A.O. Queiroz, P.R. Bignardi, M.V. Danieli, J.P.F. Guerreiro, the Results of a Comparison of a Brazilian and an Imported Knee Prosthesis - 5 Years of Follow-Up, *Acta Ortop Bras* 30 (2022) 1–3. <https://doi.org/10.1590/1413-785220223001e253870>.
- [272] P. Jeyachandran, S. Bontha, S. Bodhak, V.K. Balla, B. Kundu, M. Doddamani, Mechanical behaviour of additively manufactured bioactive glass/high density

- polyethylene composites, *J Mech Behav Biomed Mater* 108 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103830>.
- [273] Q. Ye, Y. Zhang, K. Dai, X. Chen, H.M. Read, L. Zeng, F. Hang, Three dimensional printed bioglass/gelatin/alginate composite scaffolds with promoted mechanical strength, biomineralization, cell responses and osteogenesis, *J Mater Sci Mater Med* 31 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06413-6>.
- [274] E. Tamjid, Three-dimensional polycaprolactone-bioactive glass composite scaffolds: Effect of particle size and volume fraction on mechanical properties and in vitro cellular behavior, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 67 (2018) 1005–1015. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1417285>.
- [275] A. Martelli, D. Bellucci, V. Cannillo, Additive Manufacturing of Polymer/Bioactive Glass Scaffolds for Regenerative Medicine: A Review, *Polymers (Basel)* 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/polym15112473>.
- [276] F.B. Fantecelle, D.M.M. dos Santos, B.R. Barrioni, M.M. Pereira, H.A. Alcamand, M.L. Lapér, M. Houmard, E.H.M. Nunes, Structural, mechanical, and in vitro characterization of freeze-cast scaffolds prepared using a sol-gel-derived bioactive glass from the SiO₂–CaO–Na₂O–P₂O₅–K₂O–MgO system, *Ceram Int* 49 (2023) 2183–2193. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.09.185>.
- [277] N. Ghaebi Panah, R. Atkin, T.B. Sercombe, Bioactivity and biodegradability of high temperature sintered 58S ceramics, *J Eur Ceram Soc* 42 (2022) 3614–3623. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2022.02.051>.